UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1961 N° 20

Problèmes Virologiques posés en Clinique Humaine par l'Etude de 243 L. C. R. en Culture de Tissu

(Souche cellulaire Hela)

Travail de l'Institut de Bactériologie et d'Hygiène

(Professeur G. ANDRIEU.)

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en Mars 1961

PAR

MARIETTE GENARD-COSTES

Stagiaire de recherches au C.N.R.S.

Ancienne Externe des Hôpitaux

Membres du Jury	MM.	ANDRIEU	Président
		GADRAT	
		GERAUD	Assesseurs
		Mme ENJALBERT	
		MONNIER	Suppléant

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN : Monsieur LAZORTHES
ASSESSEUR : Monsieur CAUJOLLE
DOYENS HONORAIRES : Messieurs GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER
PROFESSEURS HONORAIRES : Messieurs VALLOIS, CLERMONT, DUCUING, RIBAUT, NANTA, TAPIE.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. MERIEL
Clinique médicale	M. GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologie	FABRE P.
Clinique chirurgicale et du cancer	GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BAZEX
Clinique des maladies de la tuberculose et pathologie interne	MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires	LHEZ
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL
Clinique neurologique et psychiâtrique	RISER
Clinique obstétricale	GUILHEM
Clinique odonto-stomatologique	CADENAT E.
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Clinique ORL et chirurgie maxillo-faciale	CALVET
Clinique traumatologique des membres	RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale	PONTONNIER
Anatomie	LAZORTHES
Anatomie appliquée	POULHES
Anatomie pathologique	FABRE J.
Bactériologie, hygiène et médecine sociale	ANDRIEU
Chimie biologique	VALDIGUIE
Electro-radiologie	MARQUES
Embryologie générale	BROUSSY
Histologie	BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DARNAUD
Médecine légale et médecine du travail	PLANQUES
Médecine sociale	BOUNHOURE
Parasitologie	BOUISSET
Pathologie chirurgicale	DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL
Physico-chimie	AUVERGNAT
Physiologie appliquée et pharmacologie	BAISSET
Physique biologique et médicale	BUGNARD
Propédeutique Médicale	GERAUD
Thérapeutique	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	COULOUMA
Pathologie Médicale	LAPORTE J.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Bactériologie	Mme ENJALBERT
Physiologie	M. LAPORTE Y.
Biochimie médicale	M. DOUSTE-BLAZY
Physique médicale	M. BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie pathologique	M. BOUISSOU
Histologie et embryologie	PLANEL
Parasitologie	RUFFIE J.
Physiologie	MONTASTRUC

AGREGES

Pathologie médicale	M. MONNIER
	RIBAUT
	DELAUDE
	CALAZEL
Pathologie chirurgicale	ENJALBERT
	FICAT
	PASQUIE
	SOUQUET
Médecine légale	GREZES-RUEFF
Odontostomatologie	CADENAT H.
Pédiatrie	BARDIER
Rhumatologie	RUFFIE R.

AGREGES LIBRES

Anatomie	M. THOMAS
Ophtalmologie	DEODATI
O.R.L.	CLAUX
Pathologie chirurgicale	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle	M. BOURBON
Chimie pharmaceutique	BLANC
Zoologie	DELAS
Matière médicale	VINCENT
Pharmacie chimique et pharmacodynamie	CAUJOLLE
Pharmacie galénique	STANISLAS

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	M. COUTURIER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences naturelles	Mlle MEYNIER
	M. ROUX

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie	M. BREUILLAUD
Sciences physiques	PITET

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal	M. ROCHE
Secrétaire	Mme LAFFONT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération en date du 12 mai 1891).

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1961 N° 20

Problèmes Virologiques posés en Clinique Humaine par l'Etude de 243 L. C. R. en Culture de Tissu

(Souche cellulaire Hela)

Travail de l'Institut de Bactériologie et d'Hygiène

(Professeur G. ANDRIEU.)

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en Mars 1961

PAR

MARIETTE GENARD-COSTES

Stagiaire de recherches au C.N.R.S.

Ancienne Externe des Hôpitaux

Membres du Jury	MM.	ANDRIEU	Président
		GADRAT	
		GERAUD	Assesseurs
		Mme ENJALBERT	
		MONNIER	Suppléant

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Problèmes Virologiques posés en Clinique Humaine par l'Etude de 243 L. C. R. en Culture de Tissu

(Souche cellulaire Hela)

Travail de l'Institut de Bactériologie et d'Hygiène
(Professeur G. ANDRIEU.)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546524_0096

A MON MARI

A MES FILLES

Anne, Marie-Pierre, Hélène.

A la mémoire de mes Grands-Parents

A mes Grands-Parents

A ma Soeur et à ma Nièce

A tous les miens

A ma Belle-Famille

A tous mes Amis

A ceux des miens qui m'ont précédé ici

A ma Mère

Le Docteur Jeanne COSTES

Qui est l'exemple même de l'humanité et de la bonté que l'on veut trouver chez un médecin.

Elle est de ceux qui "sympathisent".

Qu'elle trouve ici avec la preuve de ma profonde affection les remerciements pour tout ce que nous lui devons.

A mon Père

Le Docteur Pierre COSTES

Chevalier de l'Ordre de la Santé Publique

Son intelligence, sa conscience, sa droiture font notre admiration constante. Nous voudrions garder aussi longtemps que lui, l'amour et l'enthousiasme qu'il porte à son métier.

Nous lui dédions ce travail avec l'expression de notre grande affection.

A mon Oncle

Le Docteur André COSTES

C'est ici des sentiments de profond attachement que nous voulons exprimer, pour celui qui nous a suivi avec affection dès notre enfance, et n'a cessé de nous aider au cours de nos études.

A mon Oncle

Le Docteur Albert DEUMIE

Dont la bienveillance nous a entouré depuis que nous sommes entrée dans sa famille. Nous l'en remercions de tout notre coeur et exprimons ici notre admiration pour sa carrière.

A NOTRE MAITRE et PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. ANDRIEU

Professeur de Bactériologie,
d'Hygiène et de Médecine Sociale
Chevalier de la Légion d'Honneur.

Nous vous remercions d'avoir bien voulu accepter de présider notre jury de Thèse.

Après avoir été notre premier Maître de Clinique, vous nous avez donné le goût de la Biologie et depuis notre premier passage dans votre service, vous nous avez entourée d'une bienveillante sollicitude, jusqu'à nous diriger dans notre carrière et nous accepter parmi vos élèves au titre de Stagiaire de Recherches en Pathologie expérimentale.

Nous vous prions de croire en notre grande reconnaissance et en la sincérité de notre gratitude.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur J. GADRAT

Professeur de Clinique Médicale
Médecin des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous avons achevé nos études de clinique dans votre service. L'enseignement riche d'expérience que vous nous avez prodigué a magistralement complété notre éducation médicale.

En acceptant de siéger à notre Jury de Thèse vous avez fait preuve une fois encore, de l'attention bienveillante que vous avez toujours manifesté à notre égard. Nous vous en remercions profondément.

Monsieur le Professeur J. GERAUD

Professeur de Propédeutique Médicale
Médecin des Hôpitaux
Membre Titulaire de la Société Française de Neurologie

Nous n'avons pas été de vos élèves à l'Hôpital, mais à la Faculté nous avons pu connaitre la valeur de votre enseignement.

Nous sommes très touchée de l'intérêt que vous pouvez porter à ce travail et nous vous remercions tout particulièrement d'avoir bien voulu siéger à notre Jury de Thèse.

Madame le Professeur L. ENJALBERT

Professeur à la Faculté

Vous nous avez confié ce travail et nous savons combien il vous tenait à coeur. Nous espérons avoir été fidèle à votre inspiration toujours présente en nous.

Nous vous serons toujours redevable de l'apport spirituel dont nous avons bénéficié à vos côtés.

Veuillez croire à la sincérité des sentiments qui nous lient à vous.

Monsieur le Professeur J. MONNIER

Professeur Agrégé de Pathologie Médicale
Médecin des Hôpitaux

Votre sens remarquable de l'enseignement a toujours fait notre admiration, tant à la Faculté qu'à l'Hôpital.

Nous sommes heureuse de pouvoir en témoigner ici en exprimant nos sentiments respectueux.

A nos Maîtres de la Faculté de Médecine et des Hôpitaux

A Monsieur le Docteur J. AVERSENQ

Chef de Travaux de Bactériologie

A Monsieur le Docteur R. LEVRAT

Assistant d'Hygiène

A Madame le Docteur M.B. LARENG

Assistant de Bactériologie

Nous utilisons ici votre travail de tous les jours. Nous espérons lui avoir donné le sens que vous souhaitiez, et nous voulons aussi vous assurer de la confiance que vous pouvez placer en nous.

Aux Attachées de Recherches
du Laboratoire de la Chaire de Bactériologie et Hygiène

A Mademoiselle le Docteur L. LAPCHINE

Attachée de Recherches à l'I.N.H.

Votre surveillance a été attentive et constante. Votre expérience a toujours voulu nous faire franchir plus vite les difficultés de la Technique.

Nous vous en remercions très réellement.

A Madame le Docteur J. DIDIER

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

Vous nous avait fait profiter avec gentillesse de toutes vos connaissances théoriques et pratiques. Nous vous remercions de votre attitude toujours chaleureuse, mais aussi de l'exemple quotidien de travail et d'efficacité que vous nous donnez.

A nos Amis Internes et Externes des Hôpitaux

A tous les Techniciens et Techniciennes
des Laboratoires de Bactériologie de la Faculté de Médecine
et du Centre Hospitalier Régional.

I N T R O D U C T I O N

La virologie est actuellement une science mondialement étudiée, qui fait en général, l'objet de travaux dont les buts sont différents. Etude théorique de biologie pure des virus, à laquelle participent l'électronique, la chimie, la biophysique ; étude appliquée à la pathologie infectieuse où les virus sont intégrés dans le cadre général des agents infectieux.

Depuis huit ans, dans les laboratoires que dirige notre Maitre le Professeur ANDRIEU, tant à la Faculté de Médecine dans la Chaire de Bactériologie, Hygiène et Médecine Sociale, qu'au Laboratoire de Bactériologie Clinique du Centre Hospitalier Régional de Purpan, une équipe de chercheurs s'est tout particulièrement intéressée à certains problèmes virologiques liés à la pathologie humaine.

Nous avons eu le très grand honneur d'être agréee à cette équipe aux côtés des Docteurs LAPCHINE, LARENG et DIDIER, sous la direction de Madame le Professeur ENJALBERT. Celle-ci a bien voulu nous confier le sujet de ce travail. Mais en outre elle nous a communiqué de son dynamisme et de son enthousiasme, et c'est,marquée de son empreinte que partant d'un travail virologique pur, nous rejoignons la pathologie humaine dans sa réalité quotidienne.

Pour la partie virologique nous devons essentiellement remercier les Docteurs LAPCHINE, LARENG et DIDIER, sur qui repose tout l'ensemble technique des cultures de Tissu, et tout particulièrement Madame le Docteur LARENG dont le travail quotidien d'isolement des virus dans le L.C.R. est à la base de cette étude.

Ce n'est que depuis quelques mois seulement que, dans le cadre du C.N.R.S., nous avons pu les aider plus efficacement. Nous remercions Monsieur le Directeur du C.N.R.S. et Monsieur le Professeur Louis BUGNARD,Directeur de l'Institut National d'Hygiène, de nous avoir accepté dans le nom-

bre des chercheurs de pathologie expérimentale, et aussi de l'appui et des encouragements que nous recevons ; en particulier en la personne de notre parrain de Recherches, Monsieur le Docteur DELAUNAY, Chef de Service à l'Institut Pasteur.

Le service des virus de l'Institut Pasteur de Paris, s'est obligeamment prété à nos demandes de contrôle d'identification. Nous remercions ici en particulier le Docteur P. LEPINE et ses assistants, Mademoiselle F. ARTZET, le Docteur CH. CHANY, le Docteur J. MAURIN, le Docteur F. ROGER et Madame J. VIRAT.

Enfin notre gratitude se doit de dire que le présent travail n'a pu être entrepris que grâce à une importante subvention de recherches de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

Pour la partie clinique, nos remerciements vont aux services dont nous avons reçu les prélèvements. (Service de Messieurs les Professeurs ANDRIEU, GADRAT, LAZORTHES, RISER, PLANQUES, VIRENQUE et de Monsieur le Docteur PUJO du Centre Hospitalier d'Auch).

Nous tenons en particulier à remercier Monsieur le Professeur SOREL, Monsieur le Professeur Agrégé BARDIER, Messieurs les Assistants, Chefs de Clinique et Internes de la Clinique de Médecine Infantile. Nous avons toujours été reçue amicalement quand nous sommes venu rechercher les détails cliniques des observations, et nous tenons à manifester à tous ici notre vive reconnaissance.

La Virologie étant encore de nos jours en remaniements continuels, elle parait parfois à la limite de l'hypothèse attendant une confirmation. C'est pourquoi nous avons accordé une grande importance au premier chapitre des rappels historiques, car il explique la façon inhabituelle dont s'est bâtie la science virologique.

Au cours du deuxième chapitre, nous avons essayé de classer les syndromes neurologiques dus aux agents viraux, dans un double but :

- avoir présent à l'esprit le large éventail de la pathologie virale,
- trouver dans ce domaine complexe, la place de nos observations.

Un troisième chapitre concerne les techniques employées pour ce travail.

Dans le quatrième chapitre nous exposons l'ensemble de nos résultats.

Un cinquième chapitre plus important que les précédents, est réservé à l'étude détaillée des virus isolés et des syndromes cliniques au cours desquels ils ont été rencontrés.

Dans notre chapitre de discussion terminale, nous essayons de souligner les problèmes importants ou nouveaux soulevés par notre travail, puisqu'il traite d'un domaine jusqu'ici peu étudié, la recherche systématique des virus présents dans le L.C.R. au cours de syndromes neurologiques divers.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

La pathologie des virus à neurotropisme dominant ou accessoire n'est pas encore parfaitement délimitée, bien qu'entrevue il y a 2 siècles déjà.

C'est en effet au XVIIIe siècle que WILLIS et MORGAGNI (60) constatent, dans des vérifications nécropsiques, une inflammation purulente du tissu cérébral, opposé à une inflammation purement congestive. A la fin du XIXe siècle, Pasteur isole l'agent d'une affection à virus neurotrope, la rage, et démontre qu'elle est due à cet agent transmissible. A partir de 1890, date de la première ponction lombaire, vont s'isoler les méningoencéphalites à liquide clair. On reconnaît alors qu'elles procèdent fréquemment par épidémies d'importance variable, revêtant un caractère nettement infectieux. Ce caractère épidémique et infectieux fut le premier lien qui permit à MEDIN en 1896 de rattacher la paralysie infantile, décrite par HEINE à Stuttgart en 1840 et l'épidémie de paralysie infantile rapportée par CORDIER en France en 1886, au cas des adultes. Tous présentent les mêmes lésions histologiques localisées aux cornes antérieures de la moëlle (54).

En 1880, WERNICKE, MARIE, JENDRASSICK, attirent l'attention sur les encéphalites post-infectieuses. En 1886, BARLOW et PENROSE font une description anatomique de l'encéphalite morbilleuse, que SYDENHAM au XVIIIe siècle avait déjà placé dans les complications de rougeole (61).

En 1893, MARFAN décrit le premier une complication neurologique de la varicelle. Toujours à la fin de ce même siècle JACCOUD et TROUSSEAU parlent, après constatation nécropsiques, "d'oreillons cérébral". En 1903, NETTER affirme la participation méningée constante dans l'infection ourlienne (134). En 1904, alors que l'herpès avait longtemps fait par-

tie du domaine de la dermatologie, RAVAUT et DARRE décrivent la méningite latente qui accompagne l'herpès et le placent dans les maladies infectieuses, PHILIBERT et WIDAL continueront à individualiser la maladie herpétique dans les années suivantes (134).

En 1906, NETTER rattache à la maladie de HEINE-MEDIN des formes méningées pures, amorçant déjà le démembrement clinique et épidémiologique de la poliomyélite. C'est encore lui qui parle de méningite et de polioencéphalite zostérienne (135).

Ce début de siècle voit également les efforts expérimentaux de CARROL pour cerner le problème de la Fièvre Jaune (54).

De 1910 à 1925 le domaine virologique est occupé par 3 affections que les auteurs ont plus ou moins reliées l'une à l'autre, la maladie herpétique, l'encéphalite de CRUCHET Von ECONOMO, la grippe.

En 1917, simultanément en France par CRUCHET, MOUTIER et CALMETTES, et à Vienne par Von ECONOMO, est décrite l'encéphalite léthargique à caractère infectieux manifeste ; évoluant par foyers épidémiques (54). LEVADITI, NICOLAU et HARVIER ont effectué de solides travaux biologiques reliant étroitement cette maladie à l'agent de la maladie herpétique.

Dès 1913 la grippe fait partie des viroses et d'autres auteurs sont frappés par l'apparition synchrone de la grande pandémie de grippe et d'encéphalite épidémique.

Outre ces affections qui revêtaient l'aspect de fléau social, d'autres descriptions cliniques apportaient de nouveaux éléments au monde des virus. En 1913 c'est la Lymphogranulomatose Vénérienne décrite par NICOLAS et FAVRE, 15 ans plus tard la Psittacose (54). En clinicien et virologiste LEVADITI a pu donner la première classification des maladies à ultra-virus (58).

- les ectodermoses : Dermo-vaccine, variole.
- les ectodermoses neurotropes : Neurovaccine Herpès
- les neuroses à déterminisme exclusivement nerveux : Rage, poliomyélite.

- les Ultra-virus neuro-organotropes et viscérotropes avec une période plus ou moins grande de virémie : Fièvre Jaune, Psittacose Ornithose.
- les Ultra-virus mésodermotropes (ganglions ou organes) Maladie de Nicolas-Favre.
- les Ultra-virus prolifératifs.

Sur ces bases, bénéficiant des travaux réalisés à propos de l'encéphalite épidémique, se rangent des maladies anciennement connues, telles que l'encéphalite Japonaise ou d'été, décrite en 1924, l'encéphalite de Saint-Louis, décrite en 1933, l'encéphalomyélite équine, (1935) la Chorio-méningite lymphocytaire d'Armstrong (1937), l'encéphalite russe verno-estivale, le looping-ill écossais, les encéphalites africaines, la méningite endothélio-leucocytaire multirécurrente de Mollaret, en 1944 (54).

L'historique des virus à neurotropisme prédominant ou accessoire marque un point d'arrêt à cette période anatomo-clinique. Jusqu'aux années 1941, la technique des investigations virologiques n'a servi que de soutien parfois insuffisant aux descriptions cliniques et aux essais pathogéniques. Dès 1945 les progrès en matière de virologie vont aller très vite. Des virus seront isolés sans que l'on sache à quoi les rattacher, des souches virales vont s'accumuler avant de trouver le cadre clinique qui doit les englober. Aussi allons nous suivre les différents moyens utilisés dans l'étude des virus.

La première culture de virus in vivo a été réalisée pour la vaccine par Jenner et vulgarisée en France par la génisse de Chambon de 1880 (54). A la même époque Pasteur transforme par passages successifs sur des lapins le virus de la rage (54).

En 1909 Landsteiner et Popper (54) isolent le virus de la poliomyélite en reproduisant chez le singe la maladie de HEINE-MEDIN en tout point semblable à celle de l'enfant dont la moëlle avait été inoculée à ce même singe par voie intra-cérébrale. Ils transmettent le virus de singe à singe, démontrant le moyen de mettre en évidence les ultra-virus. En 1910, LANDSTEINER et LEVADITI obtiennent les mêmes résultats sur le singe africain par voie intra-cérébra-

le et intra-péritonéale.

Les chercheurs partent alors en quête de l'*animal récepteur* de choix, parfois facilement accessible : production de la kératite herpétique du lapin suivie ou non d'encéphalite que réalisa GRUNTER en 1912 (54) méthode qui garde encore toute sa valeur aujourd'hui (54).

Parfois l'expérimentation est plus difficile : inoculation par NICOLLE et CONSEIL en 1913 (54) de salive d'homme atteint d'oreillons, au singe macaque, chez lequel ils observent une parotidite identique à celle de l'homme. Sur le même animal, NICOLLE et LE BAILLY, en 1918 (54), démontrent que la grippe est due à un virus transmissible.

Les chercheurs n'hésitent pas à faire appel à l'homme, sur leur propre personne, comme le fit DUJARRIC DE LA RIVIERE, au cours d'études sur la grippe (42).

De 1927 à 1937, sont isolés des nouveaux virus, très divers, très divers, dans toutes les parties du monde :

1927 - STOCKES isole le virus de la Fièvre Jaune sur le singe en Asie (54).

1930 - THEILER inocule avec succès le virus de la Fièvre-Jaune à la souris (54).
HELLERSTRÖM et WASSEN inoculent le virus de la Lympho-Granulomatose vénérienne au singe (54).
Lors de la pandémie de Psittacose, isolement du virus dans les organes de la perruche par BERDSON, WERNER et coll. (91).

1933 - ARMSTRONG inocule au singe le virus de l'encéphalite de SAINT-LOUIS (54).

1934 - HAYUSHI inocule au singe par voie cérébrale le virus de l'encéphalite japonaise (54).

1938 - ARMSTRONG inocule une souche de virus poliomyélitique au rat de coton (54).

Cependant, on le voit, dans cette énumération, le singe est dans de nombreux cas, l'animal de choix. Or c'est un animal fragile, difficile à obtenir, limitant la virologie à quelques laboratoires très spécialisés. L'expérimentation animale présente une autre difficulté : présence d'agent infectieux latent de l'animal, ce qui permit à ARMSTRONG et

LILLIE en 1933 de découvrir le virus de la Chorio-Méningite Lymphocytaire, chez la souris alors qu'ils travaillent sur l'encéphalite de SAINT-LOUIS (54).

En outre, l'animal permet de prouver que le virus est transmissible, on peut reproduire la maladie indéfiniment mais le virus n'est pas encore devenu l'agent tangible, descriptible, collectionnable, à l'instar des bactéries par exemple.

Enfin, restaient des virus à isoler, pour lesquels on ne connaissait pas d'animal de choix. Les virologistes recherchent alors un moyen d'obtenir le virus sur cellule ou tissu vivant, puisque c'est là une absolue nécessité.

Les chercheurs cytologiques, en vue d'établir les facteurs de croissance, de multiplication cellulaire, ont découvert en 1907, le moyen de maintenir quelques cellules en survie. C'est la méthode de la goutte pendante de HARRISSON (135) et ISRAELI et LAMBERT (138) appliquèrent, les premiers, en 1913, cette technique à la culture du virus vaccinal. Mais on ne pouvait demander à cette méthode, limitée à quelques cellules seulement, que de faire une préparation cytologique à la recherche de corps d'inclusion. Il n'y a pas possibilité de multiplication virale importante, de passage en série. Il est impossible aussi, d'observer et de suivre l'effet cytopathogène macroscopiquement.

Il fallait adapter cette méthode nouvelle aux besoins du virologiste. Les recherches demandèrent de nombreuses années. Avant d'arriver à l'application pratique, qu'est devenue de nos jours, la culture de tissu, en 1931-1932, GOODPASTURE et WOODRUF (54) eurent l'idée d'utiliser une cellule vivante directement accessible, autonome, se multipliant pour son propre compte, sans apport extérieur. Il s'agit de l'*oeuf de poule embryonné*, que ce soit en utilisant l'embryon lui-même, le sac vitellin, ou la membrane chorio-allantoïque.

Ces auteurs mettent en évidence, les taches blanchâtres (pocks) consécutives au dépot du virus vaccinal sur la membrane chorio-allantoïque. BURNET en 1936 (54) réalise le premier isolement du virus grippal sur membrane chorio-allantoïque. Peu après il met en évidence, de la même manière, les

lésions du virus herpétique. Depuis on a vu que ces virus, grippal, ourlien (découvert par HABEL en 1946) (54) étaient cultivables en cavité allantoïque mais surtout en cavité amniotique, voie de choix pour l'isolement.

Les résultats, sont excellents pour plusieurs groupes de virus : virus hémagglutinants, virus à pocks sur membrane chorio-allantoïque, miyagawanelles, virus de la fièvre jaune, de la dengue, de l'encéphalite du West-Nile, Japonaise, Américaine, Russe, mais limités à ceux-ci. Par ailleurs, il existe des virus propres de l'oeuf (virus de Newcastle) qui risquent d'égarer les résultats.

Mais vient l'époque où la *cellule vivante*, hôte obligatoire du virus, allait être adaptée spécialement pour le virologiste à la vie "*in vitro*". Les premières modifications utiles de la technique de HARRISSON ont été apportées par CARREL et BORREL (138) qui imaginèrent des flacons à fond plat, ronds dans lesquels des fragments de tissu sont englués dans une fine couche de plasma et recouverts d'une autre couche de milieu nutritif assurant la survie cellulaire.

Dans les années 1940, des tentatives ont été faites pour donner à cette technique un support physiologiquement plus stable que le plasma, membrane de cellophane perforée, gélose tissu de ZINSSER. Le milieu nutritif était alors le liquide de TYRODE. Ces méthodes, si elles ont permis l'analyse systématique des conditions et des facteurs nécessaires à la croissance cellulaire, n'avaient pas un rendement suffisant pour l'étude virologique à grande échelle.

La culture en tube roulants a aussi été imaginée par CARREL, mais ne fut employée pour la culture des virus que beaucoup plus tard par GEY et BANG en 1939 (136). Ils montrèrent qu'il était possible de maintenir en vie pendant longtemps le virus de la lympho-granulomatose vénérienne, en culture. Des fragments de tissu englués dans du plasma, plus une petite quantité de milieu nutritif sont placés dans un tube à essai, fixés sur un tambour tournant régulièrement. Les tissus sont hors du liquide puis submergés, ainsi la respiration cellulaire se fait efficacement et les tissus peuvent être gardés vivants pendant des mois.

La véritable première application de la *culture de tissu* à la propagation des virus a été la méthode de MAITLAND (110), dite des cellules suspendues. Cette culture dépassée actuellement, doit être rappelée pour les résultats grâce à elle obtenus : ENDERS en 1948 (110) utilisa cette technique pour l'étude du poliovirus, réalisant sur une grande échelle son isolement, son identification sérologique, sa production. Dans cette méthode il n'y a pas multiplication mais survie cellulaire.

En 1950, MELNICK, RIORDAN, LI, SCHOEFFER (110) ont repris le principe de la culture de fragments de tissu qu'ils ont laissés inclinés immobiles. Comme celle des tubes roulants cette méthode a pu être utilisée pour isoler le poliovirus et pour pratiquer les épreuves de séro-neutralisation.

Enfin en 1953 DULBECCO et VOGT (43-44) ont porté le dernier perfectionnement à ces méthodes successives : c'est la préparation de cellules isolées les unes des autres par une *trypsinisation* ménagée qui détruit les ponts inter-cellulaires. Cette suspension cellulaire donne sur une surface de verre (tube, bouteille, boîte de Petri) de belles nappes formées d'une seule assise cellulaire (173).

Cette méthode permet une observation systématique de l'effet cytopathogène des virus, il devient mesurable, les titrages sont facilités ainsi que les séroneutralisations.

L'observation de la dégénérescence est plus fine et permet sinon de porter un diagnostic spécifique, du moins d'orienter une reconnaissance de l'agent viral. Il faut ici rappeler que c'est au début de l'emploi de cette méthode qu'a été décrit le color-test (SALK et YOUNGNER (144) (mesure du pH dans le liquide baignant les cellules infectées ou non). Bien que la fidélité de cette technique ne soit pas absolue (virus acidifiant le milieu, Adéno-virus par exemple) sa place reste grande en pratique virologique.

C'est également en application de la méthode des couches monocellulaires que DULBECCO et VOGT ont démontré la possibilité de produire des plages de nécrose induites par le virus. Chaque particule de virus produit une plage dans

la nappe cellulaire. La forme des plages est différente pour chaque virus inoculé, et permet un diagnostic de probabilité (43-44).

Après avoir envisagé la progression des techniques, nous allons maintenant passer en revue les différences entre les cultures de tissu employées, nous arrêtant aux plus couramment utilisées aujourd'hui, et surtout à celle qui a été la base de notre travail, la souche cellulaire cancéreuse humaine HELA GEY.

Il existe deux grands types de culture de tissu utilisés en virologie, les primocultures et les souches cellulaires proprement dites. On parle de *primoculture* en virologie pratique, lorsqu'à partir d'un tissu vivant, on obtient une nappe cellulaire qui va survivre, se multiplier, et être utilisée à ce premier stade de la vie in vitro.

Ces primocultures obtenues à partir de tissus humains jeunes ou embryonnaires, de tissus animaux jeunes ou embryonnaires, se sont multipliées dans le monde entier depuis l'emploi par CARREL (138) des monocytes et des fibroblastes de poulet. On a utilisé les tissus embryonnaires humains, fibroblastes, peau, muscle, poumon. (ENDERS, WELLER et ROBBINS (51), les tissus humains jeunes ou adultes (99) (138), prépuce, (ENDERS 138), Testicule (SYVERTON, SCHERER) (158) rein, amygdale (EVANS (53), LEPINE, BARSKI (8), coeur, (GIRARDI) (64), foie, intestin (CHANG) (21).

Ces tissus étant relativement difficiles à obtenir, on essaya le rein de souris adulte, le poumon et le rein de lapin, le rein de veau (laboratoire de l'Académie Nationale de Médecine (58) enfin le tissu simien, le coeur, le testicule et surtout le rein de singe (MORAN et MELNICK) (123) qui reste actuellement avec le rein de veau, de lapin, et la membrane amniotique humaine (ZITCER et FOGH 1955) (175), la base des recherches virologiques courantes. Mais pour renouveler ces primocultures, il faut chaque fois de nouveaux organes, donc de nouveaux animaux à sacrifier.

C'est tout l'intérêt des *souches cellulaires*. On appelle souche cellulaire une culture obtenue à partir d'un tissu vivant, indéfiniment repiquable in vitro et constitué

en théorie, par une seule catégorie de cellules. Une souche cellulaire peut être utilisée en pratique virologique quel que soit le nombre de générations cellulaires successives in vitro.

La première souche de ce type fut isolée par GEY et GEY en 1951 (63) à partir d'un épithélioma du col de l'utérus. Ces auteurs ont cultivé la souche pendant six mois sans constater de modifications morphologique, tandis que des dégénérescences kératogènes s'étaient produites avec les autres souches cancéreuses jusque là étudiées in vitro. En 1953 SCHERER, SYVERTON et GEY (146) démontrèrent que cette souche est sensible au poliovirus.

Il existe trois lignées HELA I, II, III dont la sensibilité est quasiment identique. En 1954, GEY publie ses résultats avec d'autres lignées cellulaires. La même année CHANG (21) obtient quatre souches épithéliales à partir de tissus normaux humains : conjonctive, foie, rein et appendice.

De nombreuses publications ont suivi (56-155) :

Souche cancéreuse pulmonaire humaine (7)
Lignée D 189 (LEIGH et KLINE 155) dérivée de la peau d'un enfant, ayant pris l'aspect malin in vitro.
Détroit 6 et 98 dérivée de la moelle sternale (153)
Détroit 116 dérivées d'un liquide pleural de sarcome (155)
Oregon J.III (OSGOOD) (155) à partir de leucocytes d'une leucose à monocytes.
En 1955, EAGLE (155) décrit la souche KB, dérivant d'un épithélioma du naso-pharynx.
Souche Hep II et III, à partir d'un cancer du pharynx (122)
En France, Souche EH 7 (à partir d'un carcinome du sein) et EH 8 (tissu sous-cutané et musculaire humain) (9)
Souche RBI à partir de rein de bovidés (17).

Donc cellules de primoculture et souche cellulaires sont à notre portée, quels sont leurs avantages et leurs inconvénients respectifs ?

Le tissu de primo-culture le plus employé actuellement est le *rein de singe* ; il donne de belles nappes cellulaires transparentes, sensibles à tous les virus, sauf les Adenovirus qui y poussent mal ou pas du tout. L'effet cytopathogène y est net, bien défini, le vieillissement cellu-

laire est modéré. Un inconvénient : de même que certains virus latents des animaux gênent l'expérimentation in vivo, des virus simiens peuvent se retrouver dans le tissu rénal in vitro. C'est le cas du "Foamy virus" ou virus spumeux, relativement fréquent, qui entraine une vacuolisation intense du cytoplasme et un aspect syncytial rendant toute lecture impossible. Certains virus hémadsorbants latents chez le singe, perturbent les isolements de virus hémadsorbants pathogènes humains. On a décrit aussi le virus MINIA (Monkey IntraNuclear Inclusion Agent) qui donne des lésions identiques à celle du virus de la rougeole sur rein de singe. Des virus ont aussi été retrouvés dans les primocultures d'Amnios humain.

Les souches cellulaires sont stables, ne sont pas sujettes à de tels aléas. Leur inconvénient est leur sensibilité inférieure à celles des cellules de primo-culture. Même le poliovirus, le plus facilement cytopathogène, ne se multiplie pas quelque fois sur HELA. L'isolement et surtout l'identification des autres entéro virus y sont souvent plus difficiles que sur les cellules de rein de singe.

Le virus grippal ne se multiplie pas sur HELA!

Nos tentatives de culture de la souche APR8 ont montré ce qu'avait constaté HENLE G et coll. (72). La recherche de l'hémadsortion est positive pendant les premières quarante huit heures, puis elle diminue jusqu'à être nulle dix jours après. L'effet cytopathogène était net dès les premiers jours. Après coloration à l'hématoxyline-phloxine, toute structure chromatinienne est effacée, le noyau présente une coloration uniforme mauve avec des inclusions ou des vacuoles, qui sont peut être des invaginations cytoplasmiques, car elles sont négatives à la réaction de FEULGEN. Mais, au dixième jour tout a regressé, ce qui semble démontrer que le virus grippal infecte la cellule HELA mais ne s'y multiplie pas.

Sur souche cellulaire Hela, le virus de la rougeole, de la varicelle, du zona n'ont jamais été isolés. Mais le virus ourlien, le virus syncytial y réalisent leur effet cytopathogène caractéristique comme le virus herpétique. Les Adenovirus s'y multiplient mieux que sur toute autre cellule vivante in vitro.

Ces multiples qualités, jointes à la facilité de leur production nous ont fait choisir la souche cellulaire HELA au début de nos travaux d'isolement des virus pathogènes chez l'homme. Les résultats ne nous ont pas déçus, mais il faut dire qu'ils sont dûs à un parti pris volontaire de multiplication des passages destinés à préciser, puis affirmer l'effet cytopathogène du virus isolé.

Le virus isolé est, en principe, identifiable, grâce aux épreuves de séro-neutralisation, ou par isolement sur animaux récepteurs spécifiques. Mais à ce stade même, *le problème de la relation étiologique reste entier*. Comme pour l'agent infectieux bactérien, le virus isolé ne sera pas obligatoirement responsable de l'affection en cours.

En l'état actuel de nos connaissances, sur le monde des virus, sans notion de pathogénicité obligatoire constante, sans notion de portage véritable ou d'infection latente, il faut observer *les mêmes règles qu'en pathologie infectieuses classique*. C'est en se rapprochant des règles émises par KOCH en 1891, que RIVERS en 1937 (79) établit ses "RIVERS postulates in viral diseases".

- Le virus doit être présent dans les cellules hotes où il doit donner les lésions spécifiques au moment de la maladie, ou dans le sang, ou un autre liquide organique.

- Les filtrats de matériel infectieux ne doivent pas contenir de bactéries ou autres parasites cultivables in vitro et doivent reproduire la maladie ou son équivalent chez les plantes ou animaux récepteurs.

- Des filtrats semblables à partir de tous les animaux infectés doivent transmettre à nouveau la maladie.

- Des études immunologiques et histologiques doivent comparer la spécificité et l'identité des maladies causées. Mais cela n'est pas toujours possible.

HUEBNER (79) réclame d'autres critères pour établir l'importance étiologique des virus prédominants, rencontrés au cours de maladies prédominantes.

- le virus doit être une entité réelle, transmissible en culture de tissu, descriptible : la souche doit pouvoir être envoyée à d'autres laboratoires.

- il doit provenir du prélèvement humain et non préexistant dans le matériel d'isolement.

- on doit essayer de la classer par comparaison avec des virus connus.

- le virus doit être constamment associé à la maladie dont il est l'agent étiologique.

- il est essentiel de rechercher les réponses immunologiques (augmentation du taux des anticorps neutralisants ou fixant le complément).

- l'étude expérimentale sur l'homme, volontaire ou entourage contaminé, est importante ainsi que, du point de vue épidémiologique, la recherche des neutralisations croisées, (rarement possible).

Toutes ces règles doivent aider à dépister un portage, un virus latent ou saprophyte, une association virale.

Pour les affections neurologiques, SMADEL, ADAIR et collaborateurs (149), en 1951 réclament l'isolement du virus du liquide céphalo-rachidien, et l'augmentation des anticorps neutralisants ce virus dans le sang du malade. Cette augmentation des anticorps neutralisants entre la phase aigue et la phase de convalescence montrent qu'il y a eu infection récente, même si elle a été inapparente, fait la différence entre deux virus, le responsable de la maladie et le saprophyte (79) lorsqu'il est rencontré.

Toutes ces inconnues montrent la nécessité d'avoir toujours présente à l'esprit devant tout résultat virologique la phrase d'ENDERS :

"At present, however, it would seem to be the part of wisdom and good science to preserve a vigourously critical attitude, when it is vaguely proposed that "a virus", is responsable, for a lesion of uncertain origin".

CHAPITRE II

ESSAI DE CLASSIFICATION CLINIQUE DES MALADIES DU S.N.C. DUES AUX VIRUS

Il parait maintenant utile de dresser une liste des virus reconnus actuellement capables de provoquer des méningites, méningo-encéphalites ou encéphalites.

Nous allons développer pour cela une classification établie par SOHIER en 1954 (151), dont l'inspiration clinique s'applique à notre étude. Nous l'augmenterons, au chapitre des entérovirus, de notions plus récentes (1958), inspirées de LEPINE (34). Au cours de l'énoncé des grands chapitres, nous nous attarderons plus longuement sur les affections à virus cultivables en culture de tissu, et dont en particulier l'effet cytopathogène, est bien défini.

I - MENINGITES & MENINGO-ENCEPHALITES A VIRUS BIOLOGIQUEMENT & CLINIQUEMENT MENINGONEUROTROPES

A - à méningotropisme dominant se traduisant cliniquement par une méningite.

1 - *La chorio-méningite lymphocytaire d'ARMSTRONG.* Cliniquement dans sa forme classique, c'est une méningite pure caractérisée par une hypercytose du L.C.R. très importante, toujours à lymphocytes. Elle peut se compliquer de signes encéphalitiques. D'autres formes cliniques sont décrites (grippales, pulmonaires, hématologiques) (87). Epidémiologiquement, c'est une affection automnale, à contamination accidentelle par animaux réservoirs de virus : la souris joue un rôle essentiel. Le virus est cultivable en culture de tissu et sur oeuf embryonné, inoculable à la

souris et au cobaye. Mais les dangers de contamination font préférer les moyens sérologiques (fixation du complément plutot que séro-neutralisation) pour l'établissement du diagnostic.

2 - *Méningites à virus voisins* (de MAC CALLUM, FINDLAY, DURAND et BLANC).

3 - *Méningite multirécurrente de MOLLARET* : dont le nom évoque la symptomatologie clinique. Le virus isolé en 1953 est cultivable sur oeuf seulement.

B - à neurotropisme dominant dont la manifestation clinique est encéphalitique.

1 - *Les encéphalites transmises par les arthropodes.* Ce sont actuellement celles due aux virus Arbor des auteurs Anglo-Saxons (Arthropodes-Born Virus).

Elles ont toutes le même aspect clinique, avec signes encéphalitiques prédominants (tremblement, confusion mentale, nystagmus, troubles du sommeil).

Le syndrome méningé est cliniquement variable, mais biologiquement constant, avec hypercytose lymphocytaire du L.C.R., de 100 à 1 000 éléments. Epidemiologiquement, elles sont transmises par des arthropodes (moustiques, acariens..) On peut tout en restant dans le cadre établi par SOHIER, les grouper comme l'a fait CASALS en 1958 (20).

GROUPE A hémagglutinants à 37° et à pH 6,4.

Les encéphalites équines : les souches de l'Est et de l'Ouest sont identiques. Cultivables in ovo, on recherche l'hémagglutination dans les conditions précisées plus haut. En culture de tissu, ils entrainent une destruction rapide de la nappe cellulaire. Dans ce groupe, se rangent aussi l'encéphalite équine vénézuélienne, les affections à virus Sindbis et Simliki forest.

GROUPE B hémagglutinatinants à 4° et à pH 7.

L'encéphalite de SAINT-LOUIS : les réservoirs de virus sont la poule et les autres oiseaux domestiques. Le virus cultivable sur oeuf embryonné, inoculable au singe, fait apparaitre chez le sujet infecté des anti-corps neutralisants et fixant le complément.

L'encéphalite Japonnaise B la plus grave des encéphalites dues aux Arbor virus. Le virus inoculé au singe en 1934, est cultivable en culture de tissu et sur oeuf embryonné. Il présente une communauté antigénique avec l'encéphalite de SAINT-LOUIS mais l'inverse n'est pas vrai.

L'encéphalite Russe verno-estivale qui présente une forme grave transmise par les acariens (tiques...) une forme bégnine, transmise par le lait des Ovins et des Caprins.

Les Louping-ILL écossais, outre des propriétés hémagglutinantes semblables, a des relations antigénique étroites avec la précédente. Il s'agit cliniquement, d'une encéphalomyélite du mouton, dont on décrit quelques cas humains.

L'encéphalite Australienne ou encéphalite de la MURRAY VALLEY est cliniquement identique aux précédentes.

Les affections à virus West-Nile, Ilhéos, Ntaya, Zika rentrent dans ce groupe ainsi que la *FIEVRE JAUNE*, la plus ancienne connue de toutes ces affections.
Son tableau clinique d'hépatonéphrite souvent mortelle a permis son individualisation précoce. Les premiers travaux expérimentaux sur l'homme datent de la fin du XIXe siècle, l'isolement du virus sur le singe a été réalisé en 1927 (54). Son adaptation a la souris en 1930 par THEILLER (54) ouvrait la porte à la vaccination.

L'encéphalomyocardite, comprend les encéphalites africaines puisque son agent étiologique, le virus Mengo (isolé en Ouganda en 1948) fait partie des diverses souches de virus dit E.M.C. (virus Columbia S.K., virus MM, virus EMC, LI 32) (38) - (165).

Tous ces virus sont hémagglutinants et font apparaitre dans le sérum des sujets infectés des anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination, des anticorps fixant le complément, des anticorps neutralisants. Ce sont essentiellement des virus des muridés, dont les insectes seraient les vecteurs. Rares sont les cas humains, à méningite prédominante sans atteinte myocardique (39) - (67).

C - à neurotropisme dominant, à manifestation névraxitique, à tropisme secondaire neuromusculaire. C'est depuis 1957 le groupe des entérovirus.

1 - *Virus poliomyélitique, à tropisme secondaire surtout nerveux.* Les formes spinales et bulbaires sont décrites depuis la fin du XIXe siècle (VULPIAN, HEINE, CORDIER, MEDIN) (135).

On n'a retenu qu'assez récemment, dans le cadre épidémiologique, la notion de poliomyélite non paralytique, bien que déjà décrite par NETTER (135) au début du siècle.

Entrent dans ce cadre :

- les poliomyélites abortives, ou le syndrome méningé se limite à des céphalées, sans modifications du L.C.R.

- les méningites aseptiques, syndrome méningé parfois sévère, sans signes encéphalitiques.

- des paralysies régressives.

Le virus de la poliomyélite sphérique, varie entre 30 mμ (microscope électronique) et 35 mμ (ultra-filtration sur membrane gradocol). Il se conserve bien au froid, mais est très sensible à la chaleur, (inactivé à 60° en deux minutes), et à la dessication. Sa résistance est augmentée par l'adjonction de sérum, de lait ou de crème dans le procédé lyophile. Il résiste à l'éther.

Il existe trois types antigéniques :

Type 1 - BRUNEHILDE, isolée en 1939, par HOWE et BODIAN (125) des selles d'un malade atteint de poliomyélite paralytique.

Ce type I comprend d'autres souches dont la souche MAHONNEY, et la souche LEPINE 1342.

Type II - LANSING, isolé en 1938, par Armstrong de la moelle d'un cas de poliomyélite bulbaire, comprend aussi la souche YSK et MEF I (125).

Type III- LEON, isolé en 1937 par KESSEL et STUMPERT (123) du tissu cérébral et de la moelle d'un cas de maladie paralytique chez l'enfant. Il comprend aussi la souche SAUKETT.

Toutes ces souches sont inoculables au singe (126). Seules les types II et III ont été adaptées aux muridés. Les souches MEF et SAUKETT sont adaptées à la culture in ovo. Toutes les souches sont cultivables sur culture de tissu. De nombreux tissus sont sensibles, tissu simiens, humains, y compris les lignées cellulaires repiquables.

L'effet cytopathogène se manifeste par une nécrose cellulaire en foyer. Les cadavres des cellules rétractées par plages sont visibles sur la nappe de cellules apparemment saines. A la coloration Hématoxyline-Eosine, on peut mettre en évidence des inclusions intra-cytoplasmiques éosinophiles qui repoussent en coin le noyau, lui donnant un aspect plus ou moins réniforme. Il n'y a pas de corps d'inclusion intranucléaires mais une disparition chromatinienne centrale et un froissement de la membrane nucléaire (164).

L'effet cytopathogène par coaslescence des foyers aboutit à une destruction complète de la nappe cellulaire dans un temps assez bref (quatre à six jours).

Le virus poliomyélitique fait apparaître chez le malade ou le vacciné des anticorps fixant le complément communs aux trois types, des anticorps neutralisants spécifiques de chaque type.

2 - *Les virus Coxsackie à tropisme secondaire essentiellement musculaire,* mais parfois aussi nerveux. Isolés en 1948 par DALLDORF et SICKLES (32)- (34) des selles d'un enfant atteint de poliomyélite paralytique. Ils se sont montrés pathogènes pour le souriceau nouveau né, déterminant chez lui des lésions spécifiques, qui permettent déjà de différencier :

le groupe A : paralysie flasque de l'animal, sans signes encéphalitiques. Histologiquement, lésions exclusivement musculaires (hyalinisation de la fibre musculaire à partir de foyer d'infiltration de cellules leucocytaires, monocytaires ou histiocytaires);

le groupe B : tremblements, convulsions, paralysie de l'*animal*. Histologiquement, lésion musculaires identiques et lésions de la graisse inter-scapulaire. (Mort des cellules graisseuses immatures qui se groupent et sont entourées par des zones de régénérescence) (29-30-33-34).

A l'intérieur de ces groupes, les études immunologiques ont permis d'isoler dix neuf sous groupe A et cinq sous-groupes B. De mêmes dimensions que le virus poliomyélitique, ils possèdent les mêmes qualités de résistance et de sensibilité a aux conditions extérieures, le même squelette antigénique, (anticorps fixant le complément non spécifiques de type, anticorps neutralisants spécifiques de type). Il n'y a pas d'immunité croisée avec la poliomyélite.

En cultures de tissu, dans le groupe A, seul A 9 est cultivable, et seulement sur amnios ou rein de singe (148). Tous les types B sont cultivables sur rein de singe (147)-167). Les résultats sont inconstants sur amnios et sur HELA (67). L'effet cytopathogène est comparable à celui des virus poliomyélitiques, mais la destruction est beaucoup moins rapide.

En 1949, MELNICK, CURNEN et SHAW ont constaté une myalgie épidémique dans leurs animaleries(112). Ils ont ainsi fait le diagnostic rétrospectif de la maladie de BORNHOLM décrite en 1933 (156) par E. SYLVEST et bien avant sous le nom de pleurodynie par Jan FINSEN en 1858.

Outre cette entité clinique bien individualisée et assez peu fréquente, les *virus Coxsackie B* sont à l'origine d'encéphalomyocardite néo-natale, de méningite aseptique, (27-28-31-111-112-113-114-115), de maladie fébriles non spécifiques . Certains auteurs (GEAR, MEASROCH, PRINSLOO (59) rapportent même des cas de méningoencéphalite avec isolement du virus dans le L.C.R. *Les virus A* sont responsables (80) de l'herpangine, de maladies fébriles non spécifiques, de méningites aseptiques accompagnées de rash (A 9), de méningo-encéphalite (121) et même de paralysie, (A 7), tout à fait com-

parables aux paralysies poliomyélitiques, où l'examen anatomo-pathologie démontre des lésions identiques à celles de la poliomyélite (HABLE et LOOMIS) (69).

3 - *Les virus ECHO à tropisme viscéral très atténué* et dont certains sont réduits à l'état saprophyte. Découverts en 1948, parce que cytopathogènes en culture de tissu, ils ont été individualisés parce qu'ils n'étaient pas neutralisés par les anti-serum de référence connues. Ils sont restés longtemps "orphelins" dans les classifications jusqu'à ce qu'ils soient admis dans le groupe des entérovirus en 1957 sous le nom actuel de "Enteric Cytopathic Human Orphans (24).

Ils sont sensiblement de la même taille que les virus poliomyélitiques et Coxsackie, présentent les mêmes caractères de sensibilité et de résistance.

Il n'existe pas d'animal réceptif connu (exception faite pour le virus ECHO 9 pathogène pour le souriceau (105). L'effet cytopathogène est du même type que les poliovirus, mais avec un moins grand nombre de cellules rétractées, un plus grand nombre d'inclusions intra-cytoplasmiques entourant le noyau. La destruction est beaucoup moins rapide.

On connait actuellement vingt quatre types d'ECHO virus. La classification sérologique est très complexe. Souvent, les souches nouvellement isolées ont des relations antigéniques plus larges que les prototypes, entrainant l'existence de réactions de neutralisation croisée et la distinction en sous types N, N', N". Il n'existe pas d'antigène de groupe (136).

On a pu attribuer à chaque type une ou plusieurs manifestations cliniques (15-35-77-107-111) :

- Méningite aseptique : types 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 (le plus souvent isolé) 14, 16, 17.
- Méningite aseptique avec rash : type 4, 9.
- Paralysies bénignes : types 6.
- Paralysies type poliomyélite : types 2, 4, 6, 16.
- Maladies non spécifiques fébriles avec rash : type 4, 6,9.
- Exanthème de Boston : type 16.
- Syndromes des voies respiratoires supérieures : types 8,

10, 20.
- Grippe d'été, signes gastro-intestinaux : tous les types.

On le voit, la liste est longue, et il faut ajouter les cas où les virus ECHO se comportent comme des saprophytes, souvent retrouvés dans les selles d'enfant en bonne santé.

II - MENINGITES & MENINGO-ENCEPHALITES DUES A DES VIRUS EN GENERAL CLINIQUEMENT NON MENINGO-NEUROTROPES

A - La méningite peut-être cliniquement primitive ou secondaire -

1 - *Virus de l'Herpès* (à tropisme habituellement cutanéo-muqueux). C'est un des virus les plus anciennement étudiés, particulièrement du point de vue anatomo-pathologique, puisque bien avant les cultures de tissu UNNA a décrit la dégénérescence ballonisante, et LIPSCHÜTZ les corps d'inclusion intra-nucléaire éosinophile (54) dans les lésions herpétiques.

Le microscope électronique a permis de préciser qu'il s'agit d'un bâtonnet dont la partie est dense, la périphérie lache, d'une dimension de 100 à 200 mμ. Il est résistant à la chaleur, tué à 100°, il survit plus de 40 minutes à 36°. Sa conservation est relativement faible par lyophilysation, ou congélation en milieu glycériné. LEPINE et ANTZET (97) ont montré récemment les bienfaits pour la conservation de l'addition de lait écrémé au matériel infectant.

Les moyens d'études du virus herpétique sont très nombreux (126) :

inoculation à la cornée du lapin, suivie ou non d'encéphalite,

inoculation intra-cérébrale,

inoculation à la souris, au souriceau, au cobaye, au hamster, au sigmodon.

Mise en évidence de "pocks" sur membrane chorio-allantoïde, culture sur jaune d'oeuf, sur liquides amniotiques et allantoïque.

De nombreuses cultures de tissu sont sensibles :

- primo-cultures, tissu embryonnaire humain, amnios humain, rein de lapin, rein de singe.
- souche cancéreuse HELA, où l'effet cytopathogène est un bon élément de diagnostic : présence microscopiquement de grosses cellules boursouflées "bombant dans un trou de la nappe" et à la coloration (Hématoxyline-Eosine) mise en évidence de l'inclusion intra-nucléaire à ses trois stades successifs (90) :

  - le noyau est augmenté de volume, la chromatine condensée à la périphérie, l'inclusion centrale homogène basophile.
  - l'inclusion centrale devenue éosinophile entourée d'un halo clair qui la sépare de la chromatine. Elle n'est plus homogène, mais formée de petites particules denses sphériques ou en anneaux.
  - l'inclusion augmente de volume et rejoint la membrane.

De plus les travaux de SCHERER (124) ont montré la présence de cellules géantes amitotiques. SCOTT et collaborateurs décrivent des cellules fantomes de type syncytial, des cellules géantes avec corps d'inclusion (124).

Les atteintes du système nerveux vont de la méningo-encéphalite fatale, à la méningite aigue aseptique bénigne (19).

La fréquence de la maladie herpétique et la présence d'anti-corps neutralisants dans le sang de nombreux sujets adultes exigent une grande rigueur pour porter le diagnostic étiologique d'Herpès. Cependant, dans toutes les formes de la maladie (Herpès récurrent, maladie de KAPOSI-JULIUSBERG, Gingivo-stomatite, Kérato-conjonctivite, Herpès génitaux de MAURIAC) une méningite plus ou moins latente cliniquement mais biologiquement constante est présente (RAVAUT, DARRE, et SICARD (135).

2 - *Virus des oreillons* (à tropisme habituellement glandulaire).
C'est une des affections décrite ici dont la description clinique remonte le plus loin : HIPPOCRATE. Mais l'étude

du virus lui-même a été difficile. L'inoculation à l'animal est restée contestable, jusqu'à ce que ENDERS (49) en 1945 passe le virus en série de singe à singe avec des fragments de parotide de malades atteint des oreillons, la parotide ayant été préalablement broyée et ultra-filtrée.

HENLE l'a cultivé en sac amniotique d'oeuf embryonné en 1947. C'est un Myxovirus, hémagglutinant, sensible à l'éther qui se présente au microscope électronique sous une forme régulièrement arrondie. Il est extrêmement fragile, on doit le conserver à -30° ou mieux à -70°.

Son isolement reste difficile. Sur oeuf embryonné il faut inoculer par voie amniotique un oeuf de huit jours. Six jours après, on prélève les liquides allantoïques et amniotiques, dont on recherche le pouvoir hémagglutinant.

En culture de tissu son isolement est classiquement (71) plus rapide que sur oeuf.

Sur rein de singe son effet cytopathogène est très peu différent (71) de celui du virus simien "foamy virus". Sur HELA il donne des syncytiums très nombreux ou plutôt, une lyse cytoplasmique. Les noyaux sont intacts au milieu d'une nappe amorphe sans trace de membrane. Outre l'effet cygopathogène : la culture de tissu permet la recherche de l'hémadsorption.

Il est plus facile pour porter un diagnostic d'infection ourlienne de s'adresser aux examens sérologiques. Recherche des :

- anticorps inhibiteurs de l'hémagglutinine
- anticorps fixant le complément
- anticorps neutralisants.

Les épreuves sérologiques sont utiles dans certaines formes cliniques de diagnostic difficile, méningites aseptiques ou méningo-encéphalites primitives (précédant la parotidite), ou autonomes (sans affection parotidienne). (4) Elles ont été décrites la première fois par HALLE en 1910. Les méningites aseptiques primitives représentent 10 % des cas d'oreillons (4). La méningo-encéphalite est plus rare et toujours accompagnée d'un syndrome méningé important même dans les cas où elle se présente sous la forme d'une

névraxite (paralysie des nerfs craniens ou rachidiens). Cependant WEISSENBACH, avec quelques cas d'encéphalites pure a pu poser le problème de l'encéphalite ourlienne (37).

Sauf dans ces rares cas, le L.C.R. est très perturbé, et présente une forte réaction lymphocytaire.

Le virus ourlien n'a jamais été isolé, à notre connaissance du L.C.R.

3 - *Virus de la grippe* (à tropisme rhinobroncho-pulmonaire).

Le tableau clinique de la grippe simple évoque déjà une participation méningée : Céphalée, courbatures. Mais il existe aussi des formes encéphalo-méningées, habituelles dans les formes malignes. Particulièrement fréquentes lors de la grande pandémie de 1918, elles apparaissent beaucoup plus rare de nos jours, bien que des formes graves aient été observées au cours d'épidémies récentes à virus grippal A2 (55) - (104). Ce sont pour DEBRE, des encéphaloses circulatoires (36).

Le virus grippal fait partie des myxovirus, c'est un corps ovoïde de 80 à 120 mμ au microscope électronique, à l'ultra-filtration et à l'ultra-centrifugation. Il conserve sa virulence plusieurs jours à la température de + 4°. Il est sensible à l'éther.
Sa structure antigénique est complexe :

- la fraction antigénique, la plus petite 10 mμ est soluble non infectante, non hémagglutinante, mais responsable de l'antigénicité de type qui entre dans la réaction de fixation du complément.
- le corpuscule antigénique le plus important, 100 mμ infectieux, hémagglutinant, entraine la formation d'anti-corps neutralisant.

L'étude de cet antigène a permis la description de 3 types A, B, C.

Le type A a subi depuis la première souche WS isolée en 1933 (91) des modifications antigéniques entrainant l'apparition de sous-groupe à côté du prototype antérieur. Actuellement il faut y ajouter la souche A1 et la souche A2.

Le type B parait plus stable, les souches isolées récemment s'éloignent peu des deux prototypes LEE (1940) et BON (1943).

Le type C, souche 1233 n'a qu'un seul type antigénique, il est difficile à cultiver, exigeant de basses températures.

Outre les différences antigéniques entre types A, B et C il existe au sein de chaque type des phases antigéniques, intéressantes à étudier du point de vue épidémiologique.

Cultivé sur oeuf en 1936 par BURNET (54), on continue à isoler les virus grippaux par ce procédé, en recherchant le pouvoir hémagglutinant du liquide allantoïque et amniotique de l'oeuf inoculé au IIème jour (100).

En culture de tissu l'effet cytopathogène est tardif (119) (cytoplasme granuleux, arrondissement, gonflement des cellules atteintes; pas de destruction complète de la nappe) on peut pratiquer l'hémadsorption dès la 48ème heure ; puis au 6ème jour (163). S'il est isolé assez fréquemment des lavages de gorges le virus grippal ne l'a jamais été à notre connaissance du L.C.R.

Il faut citer ici les virus de la maladie de NEWCASTLE, les myxovirus para-influenzae hémadsorbants (2) tels le virus Sendaï, le virus CA (Chanock), le virus HA I et le virus EA 102 récemment isolé par Chany, encore qu'ils n'aient jamais été retrouvé dans le L.C.R., ou associés à des manifestations neurologiques (98).

4 - *Adénovirus* (à tropisme adéno-respiratoire ou conjonctival).

Nous ajoutons ces virus à la classification de SOHIER, car ils sont parfois retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien ou le tissu cérébral : c'est en effet la belle observation de M. LELONG, P. LEPINE et coll. (93).

L'histoire de ces virus est un peu particulière en décembre 1953, ROWE et HUEBNER (142) étudiant une culture de tissu adénoïdien, observent une dégénérescence spontanée : ils transmettent la lésion en série, elle n'est neutralisée

par aucun anti-serum connu, mais elle l'est par un antisérum préparé à partir des cultures présentant cette dégénérescence. Les auteurs pensent avoir isolés un virus, qu'ils dénomment : AD agent.

En Janvier 1954, HILLEMAN et WERNER (73) isolent de lavages de gorge, au cours d'une épidémie d'affection respiratoire, un agent donnant en culture de tissu le même effet cytopathogène que celui décrit par ROWE et HUEBNER, et mettent en évidence dans le sérum des malades des anticorps neutralisants et des anticorps fixant le complèment.

Par la suite des publications semblables se multiplient et en décembre 1954, ROWE, HUEBNER (141) font la synthèse de ces publications, reconnaissent les caractères communs des différentes souches isolées, et donnent à ces virus le nom de virus A.P.C. Ils reconnaissent 6 types sérologiques. En mai 1956, la Commission de Nomenclature les désigne définitivement sous le nom d'*adénovirus*. On leur reconnait alors 18 types sérologiques.

Par ultra-filtration et ultra-centrifugation, on a pu déterminer leur taille entre 80 et 120 mμ. Au microscope électronique, ils se présentent sous la forme de particules sphériques isolées ou groupées en sac de billes. Les particules mesurent environ 90 mμ. Le virus est peu sensible aux variations de températures, son titre infectieux se conserve pendant 2 ans à + 4°, presque indéfiniment à -20°. Il est peu sensible aux variations de pH, et résistant à l'éther sa structure antigénique comprend : un antigène de groupe, soluble dans le milieu, qui fixe le complément en présence de la sensibilisatrice de tous les types ; l'antigène spécifique de type. Les particules virulentes ne sont neutralisées que par les antisérum préparés à partir du type strictement homologue.

Outre les 18 types humains, il existe 4 types d'adénovirus du singe et 1 type du chimpanzé. Les types les plus fréquemment rencontrés dans nos régions sont les suivants 1, 3, 4 et 7.

ROSEN (139) a démontré les propriétés hémagglutinantes des adéno-virus pour les globules rouge d'homme, de singe, de rat, et de souris, et l'existence d'anticorps inhibant cette hémagglutination dans le sérum de sujets infectés par

les adéno-virus. L'isolement des adéno-virus ne se fait qu'en culture de tissu. De nombreux tissus sont sensibles (amnios, rein humain, souche KB), le moins sensible est le rein de singe, le plus sensible la souche HELA (66).

L'effet cytopathogène est caractéristique (16) (128) à l'état frais : fine rétraction cellulaire en maille en réseau, ou trous dans une nappe compacte. A la coloration (Hématoxyline-Eosine) on trouve des inclusions intra-nucléaires de trois types : inclusion éosinophile centrant un halo clair. Elles se multiplient et forment une grosse inclusion amphophile puis basophile. Enfin condensation centrale de l'inclusion, fortement basophile à ce stade, entouré d'une vacuolisation intense du noyau "image en marguerite".

On a essayé de classer les types de virus selon la prédominance de l'effet cytopathogène (10). Ceci semble assez arbitraire et n'est pas toujours retrouvé (152-141).

Les manifestations cliniques que l'on peut rapporter aux Adéno-virus sont des :

- *Localisation respiratoires*

Rhino-pharyngite aigue (type 1, 2, 3, 4, 5)
Affections respiratoires aigues : Rhume
pneumopathies (types 1, 1, II)

Ces affections en général bénignes sont quelquefois graves chez le nourrisson (62). La généralisation de l'infestation virale a même été reconnue (93).

- *Localisation conjonctivales* (81)

Conjonctivite folliculaire bénigne (type 2, 3, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 17) parfois compliquée de kérato-conjonctivite épidémique (type 8).
Adénopharyngo-conjonctivite

- *Adénite mésentérique* (120)

Enfin les adéno-virus existent à l'état latent dans le tissu lympho-adénoïdien (comme l'a démontré leur découverte). Les types 1, 2, 5 sont les plus fréquents chez les porteurs sains. Le fait que les mêmes types aient été retrouvés chez les enfants et les adultes indique un portage assez long. Ce portage est accompagné de la présence d'anti-corés sériques. Par ailleurs on a trouvé chez les

porteurs des décharges intermittentes de ces virus dans les lavages de gorge et dans les selles pendant plusieurs mois (141).

B - La méningite ou méningo-encéphalite survient au cours ou au décours d'une des infections suivantes -

1 - *FIEVRES ERUPTIVES*

a) *Rougeole.*

Les encéphalites sont rares. L'hyperthermie, les convulsions y sont fréquentes, d'autant plus qu'il s'agit de très jeunes enfants. Le L.C.R. montre une hypercytose modérée, de 10 à 200 cellules, en majorité lymphocytaire.

Le virus a été difficile à isoler. Il est encore morphologiquement mal connu. Sensible à la chaleur, il se conserve bien par congélation ou par lyophylisation.

Découvert en 1954, sur rein de singe ; il n'est cultivable que sur tissu de primoculture. Son effet cytopathogène est caractéristique :

- sur rein humain ou de singe, masses syncytiales vacuolisées avec de nombreux noyaux qui contiennent des inclusions éosinophiles entourées d'un halo clair.
- sur Amnios (ENDERS y a adapté en 1957 la souche EDMONSTON) (50)-(117) outre la présence de syncytium identiques à ceux décrits plus hauts, présence de cellules déformées en fuseau (spindle cell). Plus les passages en culture sont nombreux, plus la cellule en fuseau prédomine sur le syncytium, surtout quand il y a peu de virus. On l'a aussi cultivé en cavité amniotique d'oeuf de poule embryonné. Il existe chez le sujet infecté des anti-corps neutralisant et fixant le complèment.

b) *Varicelle zona.*

Si les complications encéphalitiques sont rares au cours des varicelles, RAVAUT, DARRE, et SICARD (61) ont montré les premiers l'hypercytose constante au cours du

zona. De plus les atteintes des nerfs craniens moteurs peuvent réaliser des tableaux neurologiques définis (Syndrome de l'angle ponto-cérébelleux 172).

Le virus a été inoculé à partir des vésicules de varicelle et de zona, sur fibroblastes humains, par WELLER (168) en 1953. Il ne se multiplie que sur fibroblastes de primo-culture, son effet cytopathogène consiste en un arrondissement des cellules, augmentation de la réfringence, syncytium, inclusion intranucléaires éosinophiles. Les relations cellules hôte-virus sont particulières en cela que, le virus reste fixé à la cellule, n'est pas relaché dans le milieu, et pour le passer en série, ce sont les cellules infectées dissociées qui sont l'inoculum et non quelques gouttes du milieu.

Au microscope électronique, TOURNIER, CATHALA et BES, ont décrit l'évolution intra-cellulaire du virus (168). L'étude antigénique confirme l'identité des deux virus. On peut réaliser indifféremment une réaction de fixation du complément sur un sérum de zonateux, en présence d'antigène zostérien ou varicelleux.

c) *Vaccine.*

C'est le problème de l'encéphalite post-vaccinale, soulevé en 1907 par COMLBY (102). Elle se manifeste en général, 12 jours après la vaccination et elle est due au virus vaccinal lui même ou au réveil d'un virus latent préexistant dans le tissu cérébral.

Ce virus est l'un des plus anciennement étudié. Il est de grande dimension (200 mμ). Cultivé sur oeuf, puis en 1932, sur culture de tissu, il donne un arrondissement, puis une lyse cellulaire. Il se conserve bien, mais est très sensible aux variations de pH et à l'oxygène (c'est pour cela que la glycérine est un bon moyen de conservation).

2 - *ADENOLYMPHOÏDITES*

a) *Mononucléose infectieuse.*

Décrite en 1889, ce n'est qu'en 1907, que TURCK a attiré l'attention sur la formule leucocytaire. A côté de la

forme classique, ou sont présentes céphalées et rachialgies, les formes nerveuses sont rares, les formes méningées lymphocytaires viennent en tête, suivies des méningo-encéphalites, des publications récentes ont associé la mononucléose infectieuse, avec réaction de PAUL et BUNNEL positif au syndrome de GUILLAIN-BARRE (26) - (41).

Les divers germes figurés ayant été successivement éliminés du cadre étiologique de cette affection, les chercheurs ont pensé à un agent viral et ont essayé de l'inoculer à l'animal. Elle n'a réussi que sur le singe (WISIN en 1939, SOHIER, LEPINE et SAUTTER en 1939) (54). En 1955, les auteurs japonnais MISAO et KOBAYUSHI ont pensé avoir isolé l'agent à partir de la moelle osseuse d'un malade par passage sur la souris (118). Ils l'ont assimilé au RICKETTSIES et l'ont nommé : RICKETTSIA SENESTU.

Le seul diagnostic biologique réalisable de nos jours est la réaction sérologique de PAUL-BUNNEL, dont DAVIDHSON a amélioré la spécificité. Cette réaction assez complexe peut-être utilement précédée de la réaction de MOLONEY (3 bis).

b) *La lympho-réticulose bégnine d'inoculation et lympho-granulomatose vénérienne* entrent dans le cadre des lympho adénites à virus. On n'a jamais à notre connaissance rapporté des manifestations méningées qui leur soient imputables.

3 - *HEPATITES INFECTIEUSES*

Il n'est pas rare que l'ictère infectieux ou d'inoculation soit accompagné de troubles nerveux, de réaction méningées, encéphalites, polynévrites (75). On sait la confusion qui règne dans l'étiologie des deux affections, la dénomination, virus A et B, n'est qu'un cadre d'attente dans la connaissance de l'agent pathogène.

Il n'y a pas d'animaux récepteurs, il n'a jamais été isolé de façon certaine en culture de tissu (133). Certains auteurs auraient réussi à le cultiver sur membrane chorio-allantoïdienne ou embryon de poulet (13) mais ceci demande encore confirmation. Seule l'expérience sur volontaires a permis de mettre en évidence quelques caractères épidémio-

logiques :

- *Transmission du virus A* par toute contamination fécale (le virus est éliminé par les selles).
- *Transmission du virus B* par un sérum déjà infecté (pathologie de la seringue (54). Seuls les examens biochimiques permettent actuellement le diagnostic biologique et sont à l'étude des réactions d'hémagglutination avec les G.R. de différentes espèces animales (143).

Cette longue liste montre bien la complexité de la pathologie virale. Presque tous les virus, avec une fréquence variable, pouvant atteindre les méninges, l'encéphale, la moëlle, dans des circonstances étiologiques inconnues. On invoque alors le terrain individuel, ou le génie épidémique.

CHAPITRE III

MATERIEL ET TECHNIQUES

LES PRELEVEMENTS

Nos L.C.R. proviennent pour la plus grande part du Centre Hospitalier Régional de PURPAN. Ce sont essentiellement les services des Contagieux (Professeur ANDRIEU), de Médecine infantile, (Professeur SOREL), de Neurologie (Professeur RISER), de Médecine générale, (Professeurs GADRAT, PLANQUES, MERIEL), accessoirement de Neuro-Chirurgie (Professeur LAZORTHES), et de Chirurgie Infantile (Professeur VIRENQUE), qui nous ont demandé l'étude de ces prélèvements. Mais en outre rentrent dans cette étude des L.C.R. envoyés par les centres hospitaliers des villes voisines ou par les médecins de la ville.

Au début nos études ont porté sur des L.C.R. qui, envoyés au Laboratoire de Bactériologie clinique, s'étaient révélés stériles sur les milieux bactériologiques. C'est pour cela que les 43 premiers L.C.R. de cette étude ont été congelés à -20°. Par la suite, quand les prélèvements ont été envoyés pour "virologie", les L.C.R. ont été inoculés directement sur les cultures de tissu, attendant simplement à +4° le moment, le plus précoce possible, de l'inoculation.

Nous avons également abandonné, l'adjonction systématique aux L.C.R. de Pénicilline et Streptomycine, qui s'étaient montrés superflue. Donc le L.C.R. arrive en flacon stérile, du service de médecine et va être inoculé directement et sans traitement préalable dans le tube de culture de tissu.

LES MILIEUX DE PREPARATION ET D'ENTRETIEN DE CULTURE DE TISSU

La solution de HANKS (100) est la base de nos milieux. Elle est stockée à +4° en solution concentrée dix fois. Le Hanks est enrichi d'hydrolysat de Lactalbumine à 0,25 %. Ce pourcentage est suffisant pour nos cellules adaptées à cette concentration

A partir de ce schéma de base, on prépare un milieu dit "de départ" de la culture de tissu à 10 % de sérum de cheval et un milieu d'entretien à 5 % de sérum de cheval. Ces milieux sont bicarbonatés jusqu'à apparition d'une teinte rose orangée (pH 7,4) et reçoivent des antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine).

Tous ces constituants étant réunis, on filtre la solution sur bougie de CHAMBERLAND L 3, on la répartit stérilement en flacons de 250 ml, conservés à la glacière à + 4°. Pour chaque flacon de 250 ml on pratique un controle de stérilité en inoculant quelques gouttes en bouillon glucosé et en milieu de BREWER au Thioglycollate.

LES CELLULES

Nous avons régulièrement utilisé la souche HELA GEY et en même temps depuis Octobre 1959, la soucke KB. Une culture en bouteille de JOUAN ou en boite de ROUX nous sert de stock cellulaire. Quand la paroi de la boite est recouverte d'une nappe continue de cellules, elle est alors trypsinisée suivant la méthode maintenant classique de DULBECCO:

La trypsine est stockée à -20° en solution à 2,5 % dans un tampon (P.B.S.). Elle est diluée 100 fois au moment de l'emploi, toujours dans du P.B.S. La suspension de cellules ainsi dissociées est diluée dans le milieu de départ à 10 % de sérum de cheval, pour obtenir 150 000 cellules au ml. On répartit alors à raison de 0,5 ml par tube.

On surveille quotidiennement ces tubes, remplaçant, dès que l'aspect des cellules en montre la nécessité, les 0,5 ml de milieu à 10 % de sérum de cheval par 1 ml de milieu d'entretien à 5 % de sérum de cheval. Le tube de culture est inoculable, c'est-à-dire qu'il présente une nappe continue d'une seule assise de cellules saines transparentes, environ 4 à 6 jours après la répartition en tubes de la suspention cellulaire.

METHODE DE PASSAGE ET D'ISOLEMENT DU VIRUS

Nous inoculons deux tubes par prélèvement à raison de IV gouttes (environ 0,2 ml) du produit pathologique par tube. On réserve 2 tubes témoins normaux par inoculation. L'emploi d'un plus grand nombre de tubes par L.C.R. est préférable, car il multiplie les chances d'isolement du virus. Mais ceci suppose une grande richesse en cellules et surtout une manipulation importante par un nombre suffisant de techniciens.

Les inoculations sont lues après 48 heures, puis régulièrement tous les 2 jours. Ces lectures sont suivies d'un changement de milieu pour les cellules HELA dont le métabolisme très actif acidifie rapidement le milieu. L'acidification est plus lente avec les cellules KB, et le milieu est alors changé à la demande suivant l'aspect des cellules.

Chaque inoculation est suivie pendant 13 à 14 jours. La notation se fait en chiffres à partir de l'aspect cellulaire normal, de 1 pour un effet cytopathogène au tout début, 2 destruction de la moitié de la nappe, 4 pour une destruction complète. C'est alors le moment de la congélation.

La congélation à -20° intéresse les cellules et le milieu dans le tube inoculé. Elle détruit un grand nombre de cellules et dure un temps variable suivant les prélèvements. Pour le 2ème passage, après décongélation, l'ensemble de la primo-inoculation, cellules-milieu et virus possible, est transféré dans un tube neuf de cellules HELA ou KB à raison de 11 gouttes (environ 0,1 ml) par tube neuf.

Ce 2ème passage élimine un effet toxique, ou précise l'effet cytopathogène qui oriente le typage ultérieur. S'il n'y a pas de manifestation cytopathogène au bout de 14 jours, on congéle le 1er passage et l'on pratique alors 5 passages aveugles successifs. Dans le cas d'un effet cytopathogène tardif, au 5ème passage par exemple, on continue l'étude sur un 6ème et même un 7ème passage. Ceci est assez fréquent avec les cellules HELA ou KB dont la sensibilité à certains enterovirus, même lorsqu'elle existe, est moins grande que celle des cellules de rein de singe par exemple. *La technique de typage* du virus cytopathogène ainsi isolé sera envisagé à propos de chaque groupe de virus, car elle revêt quelques particularités propres au virus envisagé.

LES OEUFS EMBRYONNES

Outre la culture de tissu, il nous a semblé bon d'inoculer les L.C.R. sur oeuf embryonnés à la recherche de virus hémagglutinants. Nous avons repris les L.C.R. dont le diagnostic clinique pouvait évoquer une étiologie grippale ou ourlienne. Il faut remarquer que la longue congélation de ces prélèvements a évidemment diminué nos chances de résultats positifs.

L'inoculation est faite par voie amniotique sur oeuf de 8 jours pour le virus ourlien, de 11 jours pour le virus grippal, à raison de 0,2 ml de L.C.R. Cinq jours après pour le virus ourlien, 48 heures après pour le virus grippal, on prélève séparément le liquide amniotique et le liquide allantoïque, dont on recherche le pouvoir hémagglutinant en présence d'hématies de poulet. Nous avons fait pour chaque L.C.R. étudié, 2 passages aveugles, quelquefois 3. Comme pour la culture de tissu ces résultats sont complétés par un typage quand le virus a été isolé.

COLORATION*

Dans de nombreux cas, la coloration précise les indications données par la lecture directe sur tube de culture de tissu, mais souvent elle apporte un diagnostic positif sûr, lorsque les virus entrainent une lésion spécifique de la nappe cellulaire : soit inclusion intra-nucléaire, soit formation syncytiale.

Le stade de choix pour la coloration est celui noté 1 + ou 2 au maximum. Au dela, la lésion trop avancée ne permet pas d'obtenir des résultats valables. Nous avons utilisés les tubes à lamelles généralement employés par les virologistes, lors de nos premiers essais dans ce domaine. La suspension cellulaire, de façon habituelle, forme une nappe qui recouvre la lamelle et la surface adjacente. Il suffit au moment choisi de retirer la lamelle et de pratiquer fixation et coloration selon les techniques histologiques habituelles. Puis on monte la lamelle au baume, la face cellulaire étant appliquée contre la lame support.

Par la suite, nous avons adapté une technique décrite par MELNICK (110), que nous pratiquons couramment. Il s'agit de l'inclusion au collodion de la nappe cellulaire directement sur le tube de culture de tissu. Après avoir vidé le milieu de culture dans un cristallisoir rempli d'une solution antiseptique, le tube portant la nappe cellulaire va subir les 3 temps successifs : fixation, coloration, inclusion.

1°) *Temps de la fixation* :

Nous avons utilisé dans nos débuts le liquide de BOUIN car c'est le fixateur le plus couramment employé par les virologistes. Cependant après de nombreux essais, il nous est apparu que le fixateur de CARNOY lui était supérieur. Non seulement il ne provoque pas d'artéfact prêtant à con-

*Nous devons ici exprimer nos remerciements au Dr A. GUILHEM, Chef de Travaux Pratiques d'Histologie qui a toujours aimablement mis à notre disposition ses connaissances et ses techniques.

fusion, ce qui l'aurait fait immédiatement rejeter, mais surtout, il fait apparaitre avec une netteté parfaite le réseau chromatinien. De plus il apporte une précision supplémentaire, l'élimination de toutes les inclusions graisseuses étant donné qu'entre dans sa composition une assez forte proposition de chloroforme, solvant des graisses.

Une demi-heure de fixation suffit tant pour l'un que pour l'autre de ces liquides. Si l'on ne peut pratiquer la coloration dans les 18 à 20 heures qui suivent la fixation, on peut choisir alors la fixation au BOUIN-HOLLANDE, qui permet d'attendre 15 à 20 jours et donne d'assez bons résultats, comparables à ceux de BOUIN simple. Ces 3 fixateurs conviennent essentiellement avant une coloration à l'Hématoxyline-Eosine. Si l'on veut pratiquer une réaction de FEULGEN, il faut fixer demi-heure au DUBOSQ-BRASIL.

Après la fixation on se débarrasse des excès de fixateur selon les techniques habituelles : procédé de JELLINECK pour le BOUIN et le BOUIN-HOLLANDE, passage de l'alcool absolu à l'alcool à 70° puis à l'eau distillée pour le CARNOY.

C'est alors le moment de la *coloration*.

Comme la fixation elle se fait dans le tube de culture de tissu. La coloration des virologistes est l'Hémalun-Eosine. Nous avons adopté une variante : Hématoxyline-Phloxine employée depuis longtemps déjà par les anatomo-pathologistes Français.

L'hématoxyline donne une meilleure imprégnation chromatinienne. Son inconvénient est théoriquement de s'oxyder et ainsi de s'altérer dans un délai de 6 mois, mais nous ne l'avons pas constaté depuis 18 mois d'utilisation. La Phloxine à 2 % résiste mieux que l'Eosine aux traitements spéciaux nécessités par l'inclusion au collodion.

Technique Hématoxyline-Phloxine

Hématoxyline de Harris	4 mn
Eau courante	1 mn
Solution de ClH à 0,5 %	5 rinçages
Eau courante	8 mn
Phloxine	4 mn

Rincer abondamment.

Technique de la coloration de Feulgen

Hydrolyse par le ClH normal, porter le tube ainsi rempli pendant 20 mn à l'étuve à 60°

Rincer à l'eau distillée

Schiff 15 mn

3 Bains d'eau sulfureuse pendant 2 mn.

Sulfite de Na à 10 %	10 cc
ClH N	20 cc
Eau distillée	120 cc

2 bains d'eau pendant 10 mn

Recolorer le fond au vert de méthyle.

La coloration terminée, on monte la gamme des alcools pour préparer *l'inclusion au collodion.*

On remplit le tube de collodion officinal :

Selnicoton	5 gr.
Alcool à 95°	20 gr.
Ether officinal	75 gr.

On laisse en contact 20 à 30 m. On vide le tube en le tournant entre les doigts. On le fait sécher renversé 15 à 20 mn à l'étuve à 37°. Après ce laps de temps on remplit le tube d'eau. Si le collodion n'est pas tout à fait sec il devient opalescent au contact de l'eau, ce qui disparait au passage dans les alcools et le toluène.

On décolle la partie supérieure de ce véritable moule intérieur de collodion. On glisse une fine spatule entre le tube de verre et le 2ème tube de collodion ainsi formé, on le décolle complétement, et on le retire de son moule de verre. Il suffit alors de la découper tout autour de la nappe cellulaire facilement réparable puisqu'elle est colorée. On applique ce fragment de collodion contenant toute la nappe cellulaire, sur une lame de verre et après le passage dans les alcools et le toluène, on monte au baume sous lamelle.

Il est bon de mettre à sécher sous un poids à l'étuve à 60° pendant 24 heures, pour écraser l'épaisseur du collodion qui pourrait soulever la lamelle et amener la formation de bulles d'air.

Cette technique ne donne peut-être pas des résultats aussi parfaits que le tube à lamelle, parce que la coloration passe 2 fois par les alcools, que le décollage à l'eau altère les colorants solubles dans l'eau (ceci explique le choix de la Phloxine moins soluble à l'eau que l'Eosine). De plus le collodion peut se plisser ou avoir une épaisseur irrégulière. Cependant il est rare qu'au moins une partie de la nappe ne soit colorée de façon aussi valable que sur lamelle et le résultat permet toujours le diagnostic quand il est possible.

Mais le grand avantage de cette technique est la possibilité de colorer extemporanément un tube de culture de tissu inoculé aux seules fins d'isolement du virus. Dès que la lecture directe fait pressentir un effet cytopathogène intéressant l'un des tubes inoculés peut être coloré sans mise en route d'une inoculation spéciale sur tube à lamelle.

CHAPITRE IV

NOS RESULTATS : ETUDE D'ENSEMBLE

I - RESULTATS POSITIFS

Nous avons étudié de Juillet 1958 à Avril 1960, 243 L.C.R. bactériologiquement stériles. Nous avons isolé 62 souches de virus soit un pourcentage global de 25,5 %.

Les souches isolées se répartissent de la façon suivante :

NATURE DES VIRUS	NOMBRE			% du nombre de virus isolé			% du nombre de L.C.R. examinés		
Virus Herpétique	Famille 1	Groupe	Type	Famille 1,65%	Groupe	Type	Famille 0,4%	Groupe	Type
Enterovirus	48			73,35%			19,7%		
Poliovirus		28			45%			11,5%	
Type I			4			7,4%			1,6%
Type II			1			1,6%			0,4%
Type III			23			37%			9,5%
Coxsackie		5			8%			2%	
B 1			1						
B 4			2						
B 5			2						
ECHO		7			11,3%			2,8%	
identifiés part.									
Poll A			1						
Poll B			1						
Poll C			1						
identifiés total									
Type 4			2						
Type 8			1						
Type 14			1						
non identifiés		8			13%			3,4%	
Adenovirus	11			17,85%			4,5%		
Type I		5				8,1%			2,05%
Type 7		1				1,6%			0,4 %
non typés		5				8,1%			2,05%
Virus non identifiés	2			3,15%			0,9%		
TOTAUX	62			100%			25,5%		

Nous avons examiné systématiquement tous les L.C.R. quel que soit le tableau clinique qui motivait la Ponction Lombaire, parfois en dehors de toute méningite clinique ou biologique, et ceci d'une date donnée à une autre date choisie très arbitrairement sans but épidémiologique préalable.

Parmi les travaux antérieurs peu sont comparables au notre : Les auteurs se sont souvent intéressés à l'étude de la méningite aseptique pure définie par des critères cliniques, biologiques et épidémiologiques précis. Notre travail a un point de départ virologique : Isolement de virus rencontrés dans le L.C.R. sur souche Hela.

On remarque d'emblée la forte proportion d'Enterovirus isolés, et parmi eux, des Poliovirus. Ceci tient sans doute à la plus grande facilité d'isolement et d'identification du poliovirus, mais aussi à l'intégration dans notre étude d'une épidémie à poliovirus Type III, qui a sévi dans notre région en Automne et en Hiver 1959.

II - RESULTATS NEGATIFS

181 de nos L.C.R. n'ont pas permis d'isolement viral. En étudiant les données cliniques de ces examens virologiquement négatifs, nous avons pu trouver dans certains cas des raisons valables à cet échec.

Dans 23 cas l'étiologie virale est à écarter. (2 comitialité, 1 RAA, 1 intoxication, 4 hémorragies méningées chez des hypertendus, 4 méningites tuberculeuses, 2 abcès cérébraux, 1 polynévrite alcoolique, 1 traumatisme cranien, 3 vertiges, 2 méningites aseptiques otogènes).

Pour les 158 autres résultats négatifs on peut cliniquement retenir certaines étiologies virales comme probables.

Ce sont : 37 poliomyélites paralytiques
15 syndromes méningés avec myalgies, paralysie régressives, exanthème.
20 méningites aseptiques pures
1 méningite aseptique ayant précédé un zona du Facial

4 syndromes méningés avec une image radiologique type P.A.P.
11 syndromes méningés avec une affection type grippal.
3 méningites ourliennes confirmées par une tuméfaction parotidienne, avant, pendant ou après le syndrome méningé.
1 névrite optique régressive.
1 hépatite virale
2 syndromes de Guillain-Barré.

Parmi ces cas cliniques à résultats virologiques négatifs, beaucoup semblent relever d'une étiologie virale facilement identifiable. Cet échec pour les poliovirus et autres Enterovirus, peut-être attribué au hasard du prélèvement, mais aussi à l'emploi d'une seule souche cellulaire (Hela), parfois insensible à certains Enterovirus.

Le nombre de Méningite aseptique, pour lequel, il n'y a pas eu de diagnostic étiologique spécifique reste élevé. Il y rentre sans doute une forte proportion de virus que nos moyens de travail ne nous ont pas permis d'isoler.

Dans cette liste entrent les affections à virus qui ne se multiplient pas sur Hela : Virus Coxsackie, Groupe A, virus du zona, myxovirus, virus ourlien dont l'isolement à partir de produits pathologiques n'a été que très peu, rapporté. Disons pour être complet dans cette revue critique de nos résultats négatifs, que ni la clinique, ni l'épidémiologie ne nous ont jamais permis d'évoquer une Chorio-Méningite Lymphocytaire ou une Encéphalite à virus Arbor.

En fonction des recherches virologiques proprement dites, ces résultats négatifs, sont souvent isolés ou font partie d'un ensemble d'autres résultats virologiques :

128 sont des prélèvements isolés de L.C.R.

16 font partie d'un dossier virologique entièrement négatifs (selles, gorge).

18 font partie d'un dossier virologique comportant l'isolement d'un virus dans la gorge ou dans les selles.

ETUDES COMPARABLES AUX NOTRES

En France, une étude de SOHIER et BUISSIERE (151) en 1953 port sur 232 serums de Méningite à liquide clair. Les preuves sérologiques de ces résultats sont les suivantes.

étiologie	nombre	épreuve biologique +
C.M.L.	8	F.C.
Oreillons	7	F.C.
Poliomyélite	9	F.C.
Coxsackie	2	F.C.
M.T.	10	Inoculation au cobaye
L.I.M.	1	Agglutination et lyse

En Israël les travaux de BERNYSH M et GOLDBLUM N (12), en 1953-1954 s'étendent à 100 cas de Meningoencéphalites abactériennes dont ils font le diagnostic sérologique.

étiologie	nombre	épreuves sérologiques +
Oreillons	17	F.C.
Poliomyélite	25	F.C.
Coxsackie	2	F.C.
L.I.H.	1	Agglutination et lyse
Encephalite à virus West-Nile	3	F.C.
Mononucléose inf	1	Paul-Bunnel-Davidsohn

Bien qu'ils l'aient recherché, les auteurs n'ont pas eu de résultat positif pour la Chorioméningite Lymphocytaire, l'Herpès, l'Encéphalite Japonaise.

Les travaux Suédois de AFZELIUS ALM sur l'étiologie des méningo-encéphalites à Goëteborg de 1945 à 1950 sont assez comparables aux notres : c'est une étude systématique, qui outre les preuves sérologiques a essayé de mettre en évidence le virus en cause. Mais la Culture de tissu n'était pas passé dans la pratique à cette époque, et les moyens utilisés (inoculation à l'animal souris, lapin à la membrane chorio-allantoïque de l'oeuf embryonné) expliquent sans doute la pauvreté des résultats positifs (1).

Virus Isolé	Nombre sur 595 L.C.R. examinés
C.M.L.	1
Herpès	1

Nous rapportons maintenant l'énorme travail du "*Walter Reed Army Institute Research*" qui de 1941 à 1958 a recherché par la sérologie le diagnostic étiologique spécifique de 1568 cas de Méningites et Méningo-encéphalites aseptiques, et de syndromes paralytiques (116).

Cette étude a été poursuivie en trois périodes : 1941-1946 sur 374 cas par RASMUSSEN., 1947-1952 sur 481 cas par ADAIR et coll., en 1953-1958 sur 713 cas par MEYER, JONHSSON et CRAWFORD.

Cette étude dans le temps, met en évidence, la diminution des cas probables au bénéfice des cas sûrs, l'augmentation des diagnostics positifs est liée en grande partie aux progrès techniques. Ceci est particulièrement net dans les travaux de 1953-1958 où la pratique de la Culture de Tissu a permis l'étude des Enterovirus, et de cerner ainsi de très près le problème étiologique des méningites et méningo-encéphalites aseptiques.

En voici les résultats :

Etiologie	1941-46 374 cas Rasmussen			1947-1952 481 cas Adair et Coll.			1953-1958 713 cas Meyer-Johnsson-Crawford		
	+	prob.	%	+	prob.	%	+	prob.	%
Oreillons	22	35	15	42	17	12	81	0	12,8
C.M.L.	32	16	11	37	7	9	57	1	8,1
Herpès				7	0	1	17	2	2,7
Leptosp.				12	0	3	19	0	2,7
Polio							148	8	21,9
Cox. A							2	0	0,3
Cox. B							72	2	11,2
ECHO							53	0	7,4
Arbor							23	0	3,2
M T							10	0	1,4
Divers							9	1	1,4
Total diagn.+	54	45	26	98	24	25	497	24	73,1
diagn.-	275		74	359		75	192		26,9

Il faut ajouter que l'étude de 1953-1958 comporte quelques isolements d'Enterovirus à partir de Gorges, de Selles ou de L.C.R., quand on a voulu préciser le diagnostic étiologique. Nous reprendrons ces cas à propos du chapitre des Enterovirus.

Nous terminerons sur une publication Française. En 1958 LAVILLAUREIX (92) donne un tableau résumant les résultats d'ensemble de ses recherches durant les années 1956 et 1957.

Δ clinique	Nb de cas	Cas négatifs	Cas positifs	V. Polio	V. Coxs.	V. C.M.L.	V. Herp.	V. ECHO	Adeno V.	V.N. typ.
M et ME	506	310	196	85	93	6		8	-	4
Polio Paral	411	146	265	264				1		
Σme Neurol.	92	67	25	13	10		1	1		3
PAP	74	62	12						12	
Divers	263	219	49	1	39			4	3	

Il est fort intéressant de rapprocher ce travail de nos résultats.

Nous relevons tout d'abord les différences :

- Les circonstances épidémiologiques et cliniques

Recherche du virus de la C.M.L.

Epidémie de Méningite à virus Coxsackie

Recherche des Adenovirus seulement dans des cas de Pneumopathie virale, et sur prélèvement de gorge.

- Les méthodes de travail :

L'examen virologique a porté sur plusieurs types de prélèvements : (L.C.R., Gorges, Selles, Prélèvements nécropsiques). Culture de tissu de rein humain, Inoculation au souriceau nouveau-né.

Mais il existe aussi de nombreuses similitudes :

Epidémie de poliomyélite responsable ici aussi de la majorité de virus poliomyélitiques.

Isolement d'un virus herpétique sur souris, puis en culture de tissu.

Pourcentage de résultats positifs sensiblement égal au notre (à cela près que l'auteur tient compte de tous les isolements à partir de tous les prélèvements).

Présence de virus non identifiés.

CHAPITRE V

NOS RESULTATS : ETUDE ANALYTIQUE

En suivant le plan de succession donné par la liste de nos résultats positifs, nous allons maintenant reprendre, l'étude des 62 souches de virus isolés du L.C.R., qui sont la base de notre travail.

Pour chaque groupe de virus, nous traiterons successivement :

- La ou les observations cliniques des malades dont proviennent les prélèvements.
- Les résultats virologiques détaillés.
- Les certitudes ou discussions étiologiques qui en découlent.
- La comparaison de nos résultats avec les étiologies virales semblables relevés dans la littérature médicale ou virologique.

VIRUS HERPETIQUE

- OBSERVATION L 96 - PIZ. Daniel. (Service des Contagieux. Pr. ANDRIEU)

Il s'agit d'un jeune homme de 16 ans, ajusteur à Toulouse. Rien dans son passé pathologique ne retient l'attention.

Le 20 Février 1959, il présente une angine érythémato-pultacée, traitée par Pénicilline et Chloramphénicol.

Le 24 Février, apparition de céphalées violentes avec vertiges et vomissements.

Dans la nuit du 24 au 25 Février, la Température s'élève à 39°, et le syndrome méningé se complète avec l'apparition d'une raideur de la nuque.

Il est hospitalisé le 26-2-59 au service des Contagieux du C.H.R. de Purpan. (Professeur ANDRIEU).

Il présente alors : une Température à 40°
un pouls à 80
une obnubilation légère.

Son faciès est vultueux, les signes vaso-moteurs (raie méningétique) sont très importants.

L'examen neurologique apporte les constatations suivantes :

Trépied méningétique complet
Reflexes vifs, souvent polycinétiques
Pas de déficit moteur périphérique

Paralysie importante de la 7ème paire cranienne à Droite (Signe de Charles BELL, déviation de la langue, attraction de la bouche à Gauche, disparition des rides d'expression à Droite).

De plus on note un strabisme qui n'existait pas avant la maladie, indiquant une paralysie de la 3ème paire cranienne.

La Ponction Lombaire pratiquée le 1er jour montre :
Chlorures : 7,40
Glucose : 1,05
Cellules : 420 (100 % de Lympho)
Albumine : 1 gr.

La numération et formule sanguine décèlent une légère polynucléose (11.000 GB, 71 % de Polynucléaires).

L'obnubilation, le syndrome méningé, les paralysies des nerfs craniens, persistent identiques, jusqu'au 3-3-59, date d'apparition d'une éruption vésiculeuse de type herpétique incontestable au pli du coude droit.

L'amélioration clinique est nette dès ce jour, seules persistent les paralysies des nerfs craniens.

Le strabisme s'améliore rapidement, disparu à la sortie le 21-3-59, tandis que la Paralysie faciale laisse des séquelles : absence de rides frontales, impossibilité de siffler, tonicité labiale défectueuse, parésie de l'hémiface droite.

ETUDES ET RESULTATS VIROLOGIQUES -

Le L.C.R. a été inoculé sur souche cellulaire Hela, selon la technique définie plus haut, 6 jours après le prélèvement effectué le 27-2-1959.

ISOLEMENT DU VIRUS

Dès le premier passage en culture cellulaire Hela, l'effet cytopathogène s'est manifesté. Il s'est répété, identique, au cours des 2ème, 3ème et 4ème passages.

IDENTIFICATION DU VIRUS

- L'étude de l'effet cytopathogène, à l'examen direct du tube de culture de tissu, a été un premier élément présomptif. (Ballonisation des cellules, cellules boursouflées multinuclées).

- La coloration (Hématoxyline-Phloxine) a apporté une première preuve : présence d'inclusions intra-nucléaires basophiles et éosinophiles, cellules globuleuses multinuclées présentant une grosse inclusion intra-nucléaire.

Il faut noter ici :

1°) - que des cellules amniotiques humaines ont été inoculées à ce même moment avec cette souche, et qu'elles ont présenté la même lésion, mais beaucoup plus intense que les cellules Hela, la quasi-totalité des cellules étant atteinte.

2°) - que lors d'une réinoculation à 8 mois d'intervalle, la lésion reste aussi intense sur amnios, mais a notablement diminué sur Hela. Les inclusions intranucléaires ont disparu, seules persistent la présence de cellules géantes globuleuses multinuclées.

DOSSIER VIROLOGIQUE

- *Etudes de séro-neutralisation*

Le virus isolé du L.C.R. est neutralisé, par les sérums précoces et tardifs du malade avec accroissement du taux des anticorps en 22 jours.

- Neutralisation du virus isolé du L.C.R. du malade
- " " par le sérum I (2-3-59) au 1/50
- " " par le sérum II (24-3-59) au 1/100 par un antiserum herpétique de référence. Contrôle pratiqué à l'I.P. Paris (Service du Dr LEPINE).

- *Examen des selles*

1°) prélèvement au 4ème jour de l'hospitalisation : pas d'isolement de virus en culture sur souche cellulaire.

2°) prélèvement au 22ème jour de l'hospitalisation : Isolement d'un poliovirus type III.

- *Examen du lavage de gorge* :

Un prélèvement au 4ème jour de l'hospitalisation : pas d'isolement de virus sur souche cellulaire.

- *Prélèvement de la vésicule cutanée*

Fait le jour même du début de l'éruption : isolement de virus herpétique.

DISCUSSION CLINIQUE ET ETIOLOGIQUE -

Il s'agit donc bien d'une méningo-encéphalite puisqu'il y a réaction méningée tant biologique que clinique, et atteinte encéphalitique comme le prouvent : l'obnubilation, la paralysie des moteurs oculaires communs et du facial, l'atteinte des centres vaso-moteurs.

Elle s'intègre parfaitement dans le cadre qu'a décrit le Pr. RISER (134) sous la rubrique des "vraies méningites herpétiques de PHILIBERT" :
"Syndrome méningé clinique primitif précédant souvent l'éruption de quelques heures ou quelques jours. Syndrome liquidien de 15 à 700 cellules, des lymphocytes en majorité, l'albumine de 0,50 gr. à 1,50 gr.".

Nous sommes donc bien dans le tableau clinique classique, et l'isolement du poliovirus type III des selles, qui peut étonner, doit être rattaché à un portage ou une notion de contage, le malade étant hospitalisé dans un service de Contagieux où sont traités des poliomyélitiques.

Des nombreuses observations comparables publiées, nous ne retiendrons que celles ou il y a eu isolement du virus dans le L.C.R. ou le Tissu Cérébral.

Le problème des Méningo-encéphalites herpétiques a été étudié depuis longtemps ; en effet en 1929, le rapport de la commission MATHEWSON (109) sur l'épidémiologie des encéphalites épidémiques note 9 cas d'isolement de virus herpétique : 5 du cerveau, 3 du L.C.R. (1 du naso-pharynx).

En 1933 HISSART rapporte l'inoculation positive à la cornée du lapin du L.C.R. d'un malade atteint de Méningite aseptique (74).

En 1941 SMITH et LENNETTE inoculent à la souris par voie intra-cérébrale le cerveau d'un enfant mort d'encéphalite. Ils isolent ainsi le virus par passages successifs et mettent en évidence des inclusions intra-nucléaires herpétiques dans le cerveau de l'enfant (150).

En 1943, ARMSTRONG publie l'isolement du virus herpétique sur la souris à partir du L.C.R. d'un malade suspect de Chorio-méningite lymphocytaire (6).

En 1944 la "Virus and Rickettsial Division Army Medical School", rapporte l'isolement par inoculation à l'animal d'une souche de virus herpétique à partir du L.C.R. d'un soldat atteint d'encéphalite (169).

En 1946, une publication de ZARAFONTIS, rapporte le cas d'une encéphalite herpétique fatale avec isolement, par passage à l'animal, du virus herpétique (174).

En 1946 dans ses travaux cités plus haut, AFZELIUS ALM isole par passage sur la souris un virus herpétique dans un cas de méningite aseptique.
De plus apparaît ici la notion des Anticorps neutralisants (1).

En 1953, BERNHEIM, SOHIER et Coll. rapportent un cas d'encéphalite chez un enfant avec stomatite herpétique. Ils ont cultivé le virus à partir du LCR, sur souriceaux, et ont mis en évidence l'anticorps fixant le complèment (11).

En 1955, THIEFRY S., MARTIN C. et DROUHET V. ont isolé sur lapin et souris le virus, d'un LCR d'un enfant mort d'encéphalite. Ils ont apporté la preuve sérologique par la mise en évidence des anticorps neutralisants (160).

On peut relever plusieurs points communs à ces observations et à la nôtre :

- *L'aspect étiologique* : il s'agit toujours d'enfants ou d'adultes jeunes, le malade le plus âgé a 28 ans.

- *L'aspect clinique* : les signes méningés sont toujours présents (une seule exception).

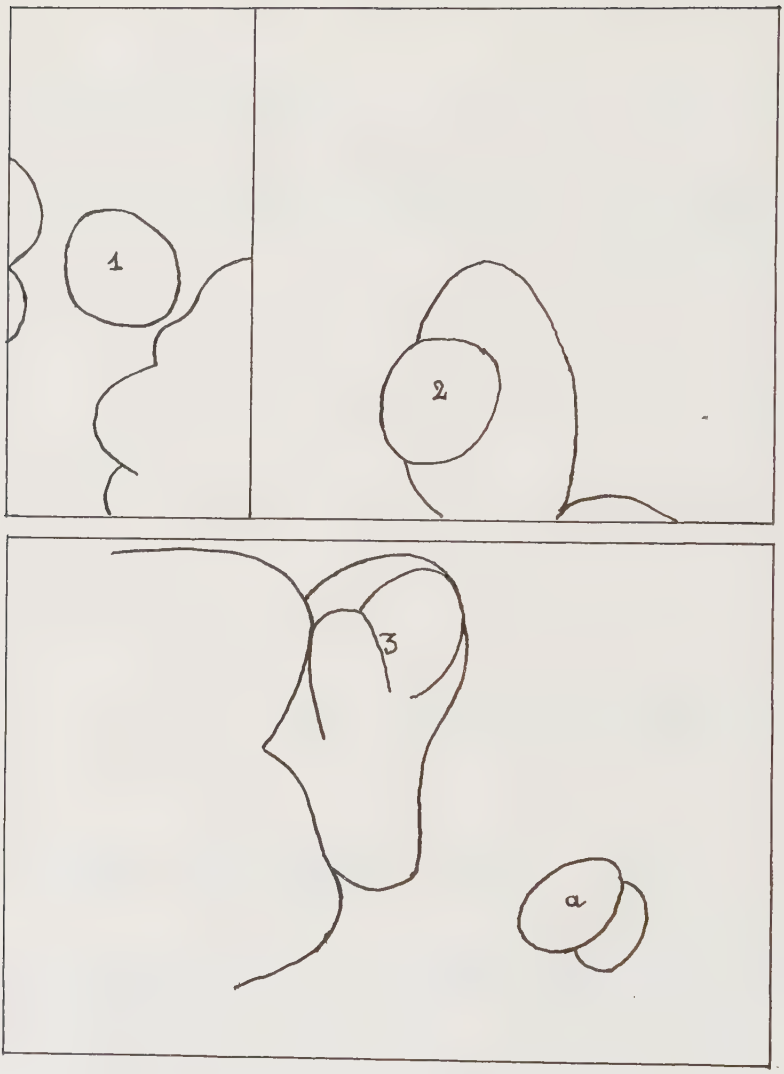
- *Les signes encéphalitiques* sont constants (Syndrome confusionnels, inégalité pupillaire, atteinte des nerfs craniens, nystagmus).
Dans 4 cas, avec le nôtre, l'éruption herpétique est apparue après le début de la méningo-encéphalite.

- *L'aspect biologique* : une leucocytose sanguine constante, de 11 000 à 18 000 GB, la formule précisant qu'il s'agit d'une polynucléose. Le LCR constamment anormal révèle une hypercytose de 175 à 700 cell., une albuminorachie de 0,46 à 1 g.

Par contre la *technique virologique* diffère essentiellement de celle de notre étude.

Dans tous les cas publiés, le virus a été isolé par inoculation à l'animal, tandis que notre travail rapporte l'isolement du virus herpétique en culture de tissu.

Il semble actuellement, et notre observation en est un cas nouveau, que l'on puisse homologuer la méningo-encéphalite herpétique lorsque le virus est isolé du LCR ou du tissu cérébral et que, dans le sang, existe la preuve sérologique d'une augmentation des anticorps neutralisants (96) (149).

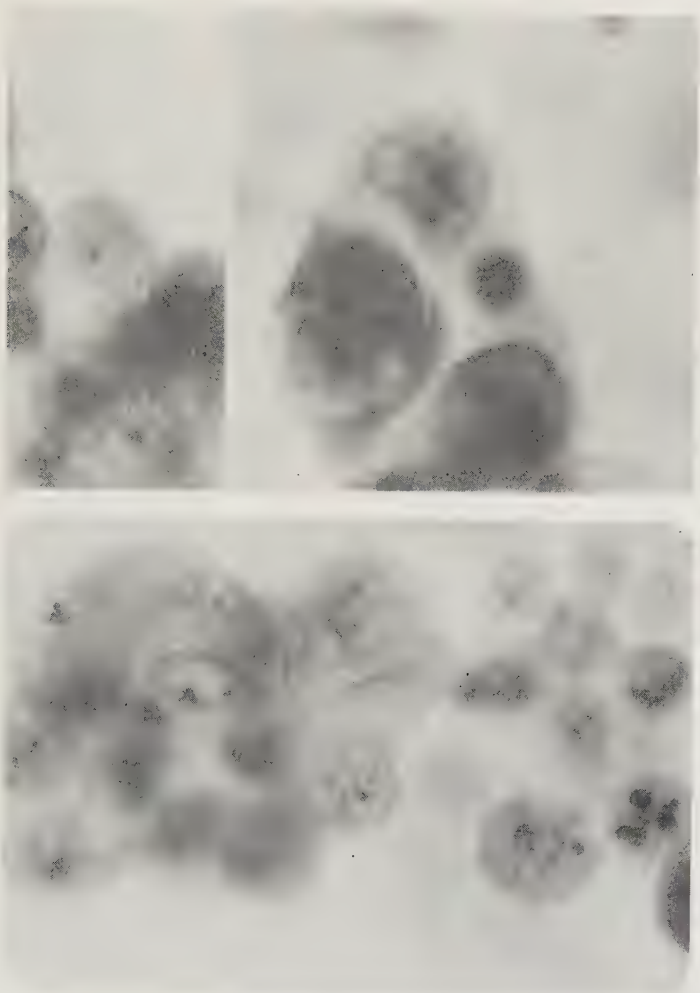


a - Cellule normale

1 - Cellule présentant l'inclusion herpétique eosinophile - margination de la chromatine.

2 - Cellule globuleuse dont les noyaux présentent l'inclusion herpétique à maturité : elle rejoint la membranne.

3 - Cellule plurinuclée dont les noyaux présentent l'inclusion herpétique éosinophile avec margination de la chromatine.



Culture de souche cellulaire Hela Gey 36 Heures après l'infection par un virus herpétique
Grossissement microscopique x 300 env. (Photog. x 3)

E N T E R O V I R U S

Ils constituent la plus grande partie de nos résultats. Dans ce groupe nous trouvons 40 souches auxquelles nous ajouterons 8 souches qui n'ont pu être définitivement identifiées, mais dont l'effet cytopathogène, tant à l'examen direct qu'après coloration est celui des enterovirus (dans la mesure ou les lésions cellulaires induites par ces virus sont spécifiques).

Nous allons envisager successivement les diverses manifestations cliniques qui accompagnent la présence de ces virus dans le L.C.R.
La majorité des observations où existent des faits cliniques et virologiques concordants, sera incluse dans un double tableau général (Tableau I et II). En dehors de ces tableaux, nous citerons certains cas d'isolement de poliovirus qui s'accompagnent de syndromes cliniques assez insolites pour être soulignés.

Nous exposerons ensuite une à une les observations des cas où il y a eu isolement d'un virus Coxsackie, d'un virus ECHO, ou d'un enterovirus indéterminé.

La confrontation clinico-virologique prête souvent à discussion, d'autant plus que nous n'avons pas de preuves sérologiques. L'absence d'un dossier complet, (L.C.R., gorge , sang et selles) est souvent regrettable pour l'établissement d'un diagnostic spécifique.

POLIOVIRUS

Nous avons réuni (Tableau I et II) tous les cas cliniques qui nous semblent en accord avec les résultats virologiques. Certains points communs méritent d'être soulignés pour ces 23 malades.

a) *Les prodromes*

Précédant de 3 à 20 jours la paralysie, ils sont pra-

TABLEAU I – Poliovirus isolés dans le L.C.R. par culture sur souche cellulaire Hela Gey
Poliomyelites cliniquement certaines (paralytiques ou bulbaires)

Virologie L.C.R.		RENSEIGNEMENTS CLINIQUES						Virologie Gorge	Selles
Numéro du prélèvement	Type du poliovirus	Signes précédant la paralysie	Syndrome Clinique	Méninge Biologique	Signes cliniques principaux	Evolution	Age		
L 77	III		Absent		Quadriplégie Membres inf +++	Séquelles +++	5 ans	Absence de virus	Absence de virus
L 155	III	S. infectieux 4 jours avant	Présent	Alb : 0,60 Cell: 75	Syndrome ascendant + signes bulbaires	DCD	37 ans	Absence de virus	Absence de virus
L 168	III	Signes méningés 3 jours avant	Présent	Alb : 0,35 Cell: 24,8 L : 82 %	Paralysie Faciale Droite Troubles de la déglutt.	DCD	3 ans		
L 181	III	Pharyngite 3 jours avant	Absent	Alb : 0,80 Cell: 68	Syndrome ascendant + thoracique	Séquelles respiratoires +++			
L 187	III	S. respiratoires 4 jours avant	+++	Alb : 0,45 Cell 504 PN 70	Parésie des M. inf.	Récupération Séquelles +			
L 189	I	Pyrexie 20 jours avant	Présent	Alb : 0,80 Cell: 7	Paraplégie	Récupération Séquelles +	6 mois	Absence de virus	Polio I
L 193	III	angine 2 jours avant	Discret	Alb : 0,65 Cell: 64	Syndrome ascendant thoracique	Récupération Séquelles ++	8 ans		
L 196	III	Signes digestifs 4 jours avant	Discret	Alb : 0,45 Cell: 21,2	Paraplégie	Récupération Séquelles +	5 ans	Absence de virus	
L 209	III	Signes pulmonaires 5 jours avant	Présent	Alb : 0,60 Cell: 17,6	Paralysie du Membre Sup Gauche	Séquelles +++	5 mois		
L 211	III	Rhinopharyngite 9 jours avant	Présent	Alb : 1,30 Cell: 44 PN : 60 %	Paralysie des Memb Sup. D et Inf. G	Séquelles ++	13 ans	Absence de virus	
L 217	I	S. infectieux et méningés 10 avant	Présent	Alb : 0,55 Cel 44 PN 90%	Paralysie du Deltoïde et du M inf D	Récupération Séquelles +		Polio	Polio
L 223	III	Signes méningés 8 jours avant myalgie	Discret	Alb : 0,35 Cell: 1	Paraplégie myalgie	Récupération totale en 15 j.		III	III
L 241	III		Discret	Alb : 0,40 Cell 15 L 97%	Quadriplégie dysphagie. Strabisme	Récupération Séquelles légères	19 ans		

TABLEAU II – POLIOVIRUS ISOLES DANS LE L.C.R. PAR CULTURE SUR SOUCHE CELLULAIRE HELA
Syndromes neurologiques divers (Poliomyelite cliniquement non soupçonnée)

Virologie L.C.R.		RENSEIGNEMENTS CLINIQUES						Virologie	
			Syndrome méningé					Gorge	Selles
Numéro du prélèvement	Type du poliovirus	Signes précédant le début de la maladie	Clinique	Biologique	Signes Cliniques associés	Evolution	Age		
L 132	I	Pyrexie 3 jours avant	+++	Alb : 0,43 Cell: 576 L : 70 %		Guérison	6 ans		
L 199	III		Présent	Alb : 0,45 Cell:14,5	Myalgies Troubles psychiques	Guérison	5 ans	Absence de virus	
L 235	III		Présent	Alb : 0,20 Cell: 0,20	Image pulmonaire grippale	Guérison	8 mois	Absence de virus	
L 47	I	Dyspnée	Présent	Alb : 0,50 Cell: 32	Parésie M.S.G. Convulsions	Guérison	7 mois		
L 104 L 105	III		+++	Alb : 1,50 Cell.incomp PN : 95 %	Paralysie Faciale G transitoire (24 h)	Guérison	44 ans		
L 169	III		Absent		Hoquet. Dysesthésie Réflexes Rotuliens (-)	Guérison	18 ans	Absence de virus	Absence de virus
L 221	III		Discret	Alb : 0,40 Cell: 2	Myalgies	Guérison			Absence de virus
L 252	III	Pyrexie		Alb : 0,15 Cell: 9,6	Hypotension vertiges	Guérison	12 ans		
L 220	III	Paraplégie régressive 24 ans avant	Absent		Paraplégie type Guillain Barré	Guérison		Absence de virus	Adéno-vir. Type 7
L 212	III	Etat de mal convulsif 5 jours avant			Signes encéphalitiques Hémiplégie gauche	Séquelles +++	16 ans		

tiquement constants. Ils se manifestent par une atteinte du tractus digestif (angine, rhino-pharyngite, épisode intestinal), mais aussi parfois par des signes respiratoires. Le syndrome myalgique semble moins fréquent qu'il n'était classique de le dire il y a une quinzaine d'années. Ceci est dû probablement au démembrement étiologique des affections "type-polio".

b) *Le syndrome méningé* -

Cliniquement, il n'est pas constant, souvent léger.
Biologiquement, il est absent dans 3 de nos cas :
(L. 221 ; L. 235 ; L. 189)

Nous rapprocherons ceci du rapport de KLEMOTA et Coll., qui citent aussi 2 cas de poliomyélite avec L.C.R. normal (88). Toujours sous l'angle biologique on peut noter que dans la plupart des cas, l'albuminorachie varie de 0,20 à 0,80 gr. pour mille et l'hypercytose de 0,20 à 75 cellules par ml.

Cependant on peut relever 3 exceptions avec une albuminorachie plus importante et une cytose très élevée à polynucléaires.

	L 104	L 187	L 211
Alb	1,50	0,45	1,30
Cell	incompt.	504	320
% poly	95	70	60

Ceci est à rapprocher de la publication de LOMBUR O. et al. qui a observé un grand nombre de polynucléaires dans le L.C.R. des méningites non pyogènes, d'autant plus que le nombre des cellules est élevé. Il a constaté une seule exception, la méningite ourlienne où les polynucléaires ne dépassent pas 10 % des cellules rencontrées dans le L.C.R. (103). C'est à la suite de cette remarque que nous pouvons citer le cas de L 132, qui aurait présenté une légère tuméfaction parotidienne avant l'hospitalisation, mais dont le L.C.R. (Alb 0,4, cell 576 70 % de lympho) présente un pourcentage de polynucléaires trop abondant pour une méningite ourlienne classique.

c) *Les signes cliniques* -

La localisation et la massivité des paralysies sont indiquées dans le tableau schématique.

Dans certains cas nous avons signalé un signe clinique plus inhabituel.

d) *L'évolution* -

Elle reste mortelle dans les cas bulbaires, d'emblée (L 168) et par syndrome ascendant (L 155). Dans les cas d'atteinte des muscles respiratoires, le pronostic vital est bon, mais le pronostic fonctionnel est mauvais. Ce dernier type de malade reste grabataire à la merci d'une surinfection bronchique bactérienne ou virale.

e) *L'épidémiologie* -

On peut retenir quelques faits étiologiques.
Il y a plus de sujets du sexe masculin que du sexe féminin. Les adultes jeunes sont aussi nombreux que les enfants de 5 à 13 ans. Mais il y a une nette extension de l'infection poliomyélitique chez les nourrissons (3 nourrissons à 5, 6 et 7 mois).

Dans un des cas de paralysie légère (L 217) l'enfant avait reçu la première injection de vaccin antipoliomyélitique, 1 mois auparavant.

La prédilection saisonnière, estivale n'a pas été retrouvée dans notre région en 1959 ; le pic de la courbe épidémiologique s'est placé en Octobre et Novembre.

f) *Les types virologiques* -

Les serotypes des souches isolées montrent une majorité des poliovirus III, qui proviennent de l'épidémie d'automne et d'hiver 1959. Comme l'indique le tableau III, toutes les formes cliniques y sont rencontrées, pour un même type de poliovirus. Ceci est en accord avec le travail de Mary O'GODENNE et RIORDAN qui ont constaté la même variété clinique dans une épidémie à poliovirus I en 1955.

Ces auteurs ont examiné les selles, les prélèvements de gorge, les L.C.R. de 96 malades atteints de poliomyélite Paralytique, de méningoencéphalite, et de méningite asepti-

TABLEAU III

Répartition des Types de Poliovirus
suivant le tableau clinique

	Type I	Type II	Type III	Total
Poliomyelite paralytique	2		9	11
Poliomyelite bulbaire			2	2
Ménengoencéphalite			2	2
Méningite Aseptique	1		2	3
Syndromes méningés plus parésies transitoires	1		4	5
Syndrome méningé plus myalgies			1	1
Vertiges				
Syndromes méningé plus ictère			1	1
Quadriplégie Spastique			1	1
Convulsions		1		1
TOTAL	4	1	23	= 28

que. Ils ont isolé les virus sur rein de singe, dans 90 % des selles, 40 % des prélèvements de gorge et dans un seul L.C.R. (le premier enterovirus isolé dans le L.C.R.). Le poliovirus I était à l'origine de poliomyélites paralytiques, de méningites aseptiques, d'encéphalites (124).

Dans les tableaux I et II ne peuvent être placées deux observations moins habituelles pour lesquelles l'isolement du Poliovirus dans le L.C.R. pose des problèmes autres que ceux de la maladie poliomyélitique et de ses différents aspects.

I. DED. Louis - L 200 - Isolement de poliovirus III
(Service de Médecine Infantile, Professeur SOREL).

Chez un enfant de 14 ans un syndrome méningé cliniquement discret, biologiquement peu marqué (Alb : 0,20, Cell 2,4)précède de 8 jours l'apparition d'un ictère qui a tous les caractères d'un ictère viral.
Un poliovirus du Type III a été isolé du L.C.R. et des selles.

Le syndrome méningé a été le seul signe neurologique et l'évolution a été tout à fait bénigne, sans séquelle d'aucune sorte.

Cette observation est à rapprocher de l'intéressante étude de COLORETTO F. (23) qui a observé chez 12 malades morts de poliomyélite paralytique des modifications histologiques du foie.

Il discute la ressemblance clinique, épidémiologique et histiologique avec l'ictère viral classique et suggère une propagation par le système lymphatique.

II. RAS. Rose - L 74 - Isolement de poliovirus type III
(Service de Neurologie, Professeur RISER).

C'est le cas d'une quadriplégie spastique. La malade, 37 ans s'est présentée lors d'une première hospitalisation comme une névraxite (paraplégie spastique, réflexes vifs, polycinétiques Alb. 0,12 ; Cell. 0,20).

Une aggravation est notée lors de la 2ème hospitalisation (7 mois après) : quadriplégie, avec signes psychiques bouffées délirantes, syndrome confusionnel, dysarthrie, nystagmus. L.C.R. Alb. 0,28 - Cell. 0,1.

On parle d'encéphalomyélite, de sclérose en plaques. Deux mois après, la malade sort avec une amélioration psychique, les troubles moteurs sont sensiblement identiques. La sensibilité est toujours resté normale.

Un poliovirus III a été isolé du L.C.R.

On peut simplement citer à ce propos, sans en tirer des conclusions audacieuses, le Professeur RISER, quand il dit que la sclérose en plaques, pour laquelle une étiologie virale a souvent été évoquée, "pose un problème de diagnostic, différentiel difficile avec la maladie de HEINE-MEDIN avant l'apparition de la poliomyélite élective" (135). D'autant plus que dans de nombreuses formes de la maladie poliomyélitique (Méningite aseptique, affections fébriles non différenciées) la poliomyélite élective n'apparait pas.

VIRUS COXSACKIE

Nous avons isolé et identifié 5 virus Coxsackie B dans le L.C.R. : 1 type B1 ; 2 types B4 ; 2 types B5.

La première observation rapporte un tableau clinique tout à fait en accord avec notre isolement viral.

FAB. x L 232 - Isolement d'un virus Coxsackie B4
(Docteur LALAURETTE)

Syndrome méningé aseptique, avec simple diminution des réflexes rotuliens, le tout régressant en une dizaine de jours sans séquelles. Isolement dans le L.C.R. d'un virus Coxsackie B 4.

Dans les 3 cas suivants l'évolution clinique est beaucoup plus grave que celle habituellement reconnue pour une infection à virus Coxsackie.

SEV. Gilbert L 33 - Isolement d'un virus Coxsackie B 2
(Service des contagieux. Professeur ANDRIEU).

C'est un adulte de 30 ans, qui présente une température à 38°6, un syndrome méningé clinique complet et important, et le syndrome biologique suivant dans le L.C.R. : Alb : 0,80 ; Cell 69,6. Isolement d'un virus Coxsackie B 1.

Une paralysie du bras gauche se constitue rapidement. En 8 jours, apyrexie disparition du syndrome méningé, mais il y a des séquelles : persistances de la paralysie avec fonte musculaire du deltoïde et du sus-épineux gauches.

BAT. Gérard L 182 - Isolement d'un virus Coxsackie B 4
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Enfant de 2 ans. Après quelques troubles intestinaux, sans syndrome méningé clinique. (L.C.R. Alb. : 0,45 ; Cell 21,6 ; isolement d'un virus Coxsackie B 4), apparition d'une parésie des 2 membres inférieurs et du membre supérieur gauche, qui se transforme rapidement en paralysie totale. De plus pendant 3 semaines l'enfant reste hyperalgique. Après cessation des douleurs l'impotence fonctionnelle reste tout aussi importante.

Isolement d'un poliovirus III dans deux prélèvements de gorge successifs.

SER. Louis L 183 - Isolement d'un virus Coxsackie B 5
(Service des Contagieux Professeur ANDRIEU)

Adulte de 30 ans. Sans prodromes, apparition d'un syndrome méningé clinique et biologique (L.C.R. Alb. 1,40 ; Cell 52,5 70 %. Isolement d'un virus Coxsackie B 5).

Les membres supérieurs sont algiques et parétiques. Les membres inférieurs sont indemnes. Le lendemain apparaissent des troubles de la déglutition, des troubles respiratoires bulbaires. Malgré une trachéostomie et l'utilisation de l'Engström, le malade meurt trois jours après.

CAL. Norbert L 82 - Isolement d'un virus Coxsackie B5
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Enfant atteint de Méningite tuberculeuse, prouvée par culture de bacille de KOCH sur Lovenstein, ensemencé avec le même prélèvement de L.C.R. que celui ou à été isolé un virus Coxsackie B5.

On peut dans ce cas proposer l'explication suivante : l'enfant était porteur sain de virus Coxsackie ou atteint d'une affection inapparente par ce même virus. Lors de la maladie tuberculeuse lésant ses méninges, il y a eu passage dans le L.C.R. du virus Coxsackie.

VIRUS ECHO

Nous allons ici procéder à la même discrimination. Nous rapporterons d'abord les cas où l'étiologie virale, parait plausible, puis les cas discutables, pour terminer par les cas où la présence du virus est manifestement sans rapport direct avec la maladie.

DEL. André L 11 - Isolement d'un virus ECHO4
(Service Médecine Infantile Professeur SOREL)

Un enfant de 19 mois, 8 jours après une rhino-pharyngite présente un syndrome méningé discret et une parésie des membres inférieurs. L'examen du L.C.R. donne les résultats suivants : Alb : 2,50 gr ; Cell 0,2 ; et fait porter le diagnostic de syndrome de GUILLAIN-BARRE.

On isole du L.C.R. un virus ECHO 4. Quinze jours après le début de la maladie, régression de la parésie, la marche est normale.

MOL. Claudette L 29 - Isolement d'un virus ECHO
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)
Syndrome méningé avec myalgie et épistaxis.
La P.L. permet de constater une albuminorachie à 0,15 et une cytose à 4 cellules. Isolement du L.C.R. d'un virus ECHO Pool C ; La réaction de HIRST dans le sang est positive pour le virus grippal type A'.

THO. Christian L 30 - Isolement d'un virus ECHO
(Service de Médecine Infantine Professeur SOREL)

Enfant de 5 ans qui, après une rhino-pharyngite fébrile, présente une parésie du membre supérieur droit et du membre inférieur gauche. L'examen neurologique précise qu'il s'agit de l'atteinte isolée de Deltoïde droit et des péroniers gauches.

Examens biologiques : L.C.R. : Alb : 0,30
Cell : 8,8
Isolement d'un virus ECHO du Pool B.
Dans les selles, isolement d'un poliovirus du type III.

L'enfant quitte le service avec une maladresse du bras droit et une gène à la marche ; mais revu en consultation un mois après, tout est revenu à la normale.

ESC. Lucien L 43 - Isolement d'un virus ECHO
(Service de Médecine Sud Professeur TAPIE)

La police a amené ce malade de 45 ans qui avait été trouvé dans le coma. On a pensé à une intoxication. L'examen du L.C.R. a montré : Alb : 0,20 Cell 3. Isolement d'un virus ECHO du Pool A et d'un staphylocoque peu abondant présentant les caractères pathogènes en 48 Heures.
L'Hémoculture met en évidence un staphylocoque doré.

Quarante Huit heures après l'hospitalisation le malade sort du coma, qu'il ne peut ou ne veut expliquer, mais, il se plaint de douleurs importantes des membres inférieurs. L'examen neuro-pschiatrique diagnostique une mélancolie.

ROQ. Georges L 9 - Isolement d'un virus ECHO
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Enfant ayant présenté trois crises asphyxiques d'origine inconnue. Par ailleurs dermatose de type eczéma.
L.C.R. : Alb : 0,35
Cell : 20,2
Isolement d'un virus ECHO Pool B (Probablement type 8)

ALV. Angel L 35 - Isolement d'un virus ECHO 14
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Chez un enfant de 5 ans, 48 heures après une tuméfaction parotidienne de type ourlien, un syndrome méningé complet apparait.
L'examen du L.C.R. donne les résultats suivants Alb : 0,20 Cell : 111. 60 % de lymphocytes. Isolement d'un virus ECHO 14.
Aucune autre complication ne survient, l'enfant sort guéri.

LAC. Paul L 37 - Isolement d'un virus ECHO 4.
(Service de Médecine Sud Professeur TAPIE)

Adulte de 55 ans qui présente d'abord un état confusionnel et délirant. 8 jours après se constitue un syndrome méningé net. Des complications pulmonaires et cardiaques apparaissent. La ponction lombaire fait apparaître un L.C.R. franchement purulent qui à l'examen montre des Polynucléaires altérés incomptables en une culture pure abondante de pneumocoques.

Le malade est traité par les antibiotiques par voie générale et les sulfamides par voie locale. Le L.C.R. de la ponction lombaire suivante est stérile et passe ainsi en virologie où on isole un virus ECHO 4. Le malade meurt après une vomique très importante de pus verdâtre.

Ces dernières observations posent le problème de la barrière méningée par un virus latent lors d'une affection d'étiologie différente.

ENTEROVIRUS NON IDENTIFIES

Nous avons pu retrouver 6 Observations parmi les 7 cas où un enterovirus non identifié a été retrouvé dans le L.C.R. Certaines s'intègrent tout à fait dans le cadre virologique généralement admis, d'autres au contraire sont plus difficiles à interpréter.

LACASSAGNE Jacques L 250 - Isolement d'un enterovirus non identifié
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Syndrome méningé typique qui se constitue en 48 heures et reste pur sans aucun autre signes neurologiques. L'évolution de la formule cytologique du L.C.R. est intéressante à noter

2 jours après le début de la maladie : L.C.R. Alb : 0,25
Cell : 140 (80% poly)

5 jours après le début de la maladie : L.C.R. Alb : 0,40
Cell : 70,4(60% lympho)

Au 8ème jour de la maladie l'enfant est apyrétique et sort en excellent état général.

OLI. Georgette L 26 - Isolement d'un enterovirus non identifié
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Méningite aseptique (L.C.R. Alb : 1 gr Cell : 100-80% de L.) avec disparition des réflexes rotuliens, sans parésie. Le tableau évolue en 8 jours vers la guérison complète.

SEG. Michèle L 234 - Isolement dans le L.C.R. d'un Enterovirus non identifié.
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Cette enfant à été hospitalisée pour une hémiplégie gauche ; L'examen neurologique à l'entrée a décelé un hémisyndrome cérebelleux gauche et une paralysie faciale droite.

L'examen du L.C.R. révèle : Alb. 0,20
Cell. 0,60

Isolement d'un agent qui a tous les caractères cytopathogènes d'un enterovirus, mais qui n'est neutralisé par aucun de nos anti-serums.

Les signes cliniques régressent notablement en quatre jours, seule la paralysie faciale persiste huit jours après.

Nous rapprocherons cette observation de la publication de WIENER et LAVILLAUREIX (170).

Résultats virologiques complèmentaires :

Isolement d'ou Polivirus type III dans deux prélèvements de selles successifs.

La recherche des anticorps spécifiques par l'épreuve de séro-neutralisation fait à L'Institut Pasteur de Parisdonne des résultats très en faveur d'une infection à poliovirus III :

Serum I	- Type I (1/10) :	- Type II (1/10) :	- Type III (1/160) : +
Serum II	" -	"	- Type III (1/640) +

BAR. Claude L 163 - Isolement d'un enterovirus non identifié
(Service de Neurologie Professeur RISER)

Le 17 Juillet 1959 le malade est atteint d'un syndrome méningé important Le 23 Juillet des parésies des Membres Inférieurs apparaissent et il est alor hospitalisé.

L.C.R. Alb : 0,60 ; Cell. 100. Isolement d'un agent ayant les caractères cytopathogènes d'un Enterovirus mais qui n'est neutralisé par aucun de nos antiserums.

Puis Constitution d'une quadriplégie flasque totale. Le malade est hospitalisé trois mois pendant lesquels on note une amélioration certaine du membre supérieur, mais la paraplégie reste totale.

SEZ. Joseph L 113 - Isolement dans le L.C.R., d'un Enterovirus non identifié
(Service de Neuro-Chirurgie Professeur LAZORTHES)

Malade hospitalisé, car depuis Novembre 1958, à la suite d'un épisode grippal, amaigrissement, asthénie et constitution d'une monoparésie gauche avec déficit subjectif de la sensibilité superficielle. L'E.E.G. avait suggéré une tumeur temporale, que l'Artériographie et la Ventriculographie éliminent.

Examen du L.C.R. Alb : 0,30 ; Cell. 2,4 ; Poly : 3,8 Lympho.

Isolement d'un agent présentant tous les caractères cytopathogènes d'un Enterovirus, mais qui n'est neutralisé par aucun de nos Antiserums.

Il ne se produit pas d'amélioration, il n'a pas été porté de diagnostic précis.

JON. Christian L 171 - Isolement d'un Enterovirus non identifié
(Service des Contagieux. Professeur ANDRIEU)

Lors d'une première hospitalisation, ce malade avait présenté une méningite clinique (L.C.R. : Alb 0,10 ; Cell : 1) et un petit syndrome rénal (traces d'albumine dans les urines, urée : 0,45) qui avec la notion d'une baignade antérieure en rivière avait fait évoquer une spirochétose. L'évolution est favorable, le malade quitte le service, les signes neurologiques et urinaires ayant disparu.

10 jours après, ce malade revient avec une parésie du membre inférieur droit. Nouvel examen du L.C.R. : Alb 0,30
Cell 11,2

C'est dans ce 2ème L.C.R. qu'un enterovirus a été isolé.

Un séro-diagnostic pour les spirochétoses a été pratiqué à l'Institut Pasteur par Madame KOLOCHINE-ERBER a donné les résultats suivants.

Séro-diagnostic	Leptospire	Ictero-Hémorragie	douteux
		Canicola	"
		Grippo-Typhosa	traces

Tout a regressé en 15 jours.

On peut ici penser que le spirochètes est responsable des 2 tableaux cliniques, le virus ayant franchi la barrière méningéeà la faveur de la lésion due au spirochète. Ou bien être dualiste et laisser la première manifestation au spirochète, rattachant le second tableau à l'étiologie virale. Encore que l'on pourrait rapprocher cette observation de la publication de UTZ et SCHELOKOV qui rapporte l'isolement de virus Coxsackie dans le sang, le L.C.R. et l'urine d'un malade atteint de troubles rénaux (161).

DUL. Paul L 230 - Isolement d'un enterovirus non identifié
(Service de Neuro-Chirurgie Professeur LAZORTHES)

Malade hospitalisé après un trauma cranien avec perte de conscience immédiate. Il reste obnubilé pendant 15 jours, il ne présente ni signe neurologique, ni signe méningé.

L.C.R. : Alb. : 0,30
Poly. : 2
Lympho. : 17

Isolement d'un enterovirus non identifié.

Le malade quitte le service sans sequelles 15 jours après. Il semble donc qu'ici c'est le traumatisme qui a favorisé le passage du virus au même titre que, dans les observations antérieures, les germes pyogènes, les mycobactéries, les spirochètes, ou même un autre virus.

ETUDES VIROLOGIQUES -

Les L.C.R. 9, 11, 26, 27, 29, 30, 33, 35, 37 et 47 ont été congelés et inoculés 1 à 3 mois après le prélèvement.

Tous les autres L.C.R. ont été inoculés sans congélation, huit jours au plus tard après le prélèvement selon la technique décrite plus haut.

Connaissant la sensibilité médiocre des cellules Hela pour les Enterovirus, et en particulier pour les ECHO, les passages ont été répétés jusqu'au 5ème avant d'abandonner tout prélèvement comme négatif.

Il faut noter que les virus Coxsackie, ECHO et ceux non identifiés ont manifesté leur effet cytopathogène presque toujours dès le 1er passage, sinon au 2ème. La lésion de la nappe cellulaire était très souvent discrète, ne s'affirmant que dans les passages ultérieurs.

Au contraire les poliovirus se sont manifestés le plus souvent au 3ème et 4ème passage, parfois même au 5ème ou au 6ème passage, l'effet cytopathogène était alors d'emblée très net aboutissant à la destruction de la nappe, en quarante-huit heures environ.

Ces cultures de L.C.R. ne nous auraient souvent donné que des résultats négatifs sur Hela, si nous nous étions arrêtées au premier ou au second passage.

Il est surprenant que l'effet cytopathogène discret des virus Coxsackie et ECHO soit perceptible dès les premiers passages, tandis que l'effet cytopathogène massif des poliovirus, n'est constaté qu'après deux et quelquefois trois passages aveugles.

A la coloration Hématoxyline-Eosine nous avons constaté les foyers de cellules pycnotiques particulièrement nets dans le cas des poliovirus, les inclusions intra-cytoplasmiques éosinophiles repoussant le noyau (poliovirus) ou, plus nombreuses le coiffant (ECHO). Mais de plus nous avons noté l'altération nucléaire décrite par M. REISSIG (132).

Il s'agit d'un plissement du noyau, comme si la coloration n'imprégnait que la membrane nucléaire froissée, plissée, le noyau apparaissant vide. Nous avons retrouvé d'autres images moins frappantes que cette lésion ultime et l'on peut penser qu'elles sont les premiers stades du processus cytopathogène.

En étudiant attentivement les noyaux non encore plissés on voit une chromatolyse, avec diminution de la chromathophilie, qui se manifeste par une disparition du réseau chromatinien, une apparition de mottes dont la basophilie est diminuée ; les chromocentres au contraire s'individualisant très nettement, très chromatophiles (Il ne semble pas s'agir d'inclusions comme l'avait pensé M. REISSIG). A un autre stade le noyau parait vidé et un clair nucléaire s'établit progressivement. A un troisième stade, les chromocentres sont condensés en un bloc central homogène, très chromatophile. Ce bloc est parfois entouré d'une zone acidophile plus ou moins bien limitée, absolument amorphe, qui serait formée des produits de desintégration de la chromatine (proteïnes, probablement protamines et histones).

On pourrait donc penser que le suc nucléaire se déverse dans le cytoplasme, créant aussi une hypertonie plasmatique qui, le noyau vidé, exercerait sur la membrane une pression aboutissant à l'image "noyau plissé".
Au crédit de cette hypothèse, ajoutons que la lésion noyau plissé est accompagnée d'une inclusion intra-cytoplasmique diffuse.

Cette lésion est très importante avec les virus Coxsackie, un peu moins intense avec les poliovirus, mais cependant très nette. Elle est plus difficile à mettre en évidence avec les virus ECHO où la manifestation majeure reste le grand nombre d'inclusion intra-cytoplasmique éosinophiles. Ce plissement du noyau se retrouve sur primoculture d'amnios et de rein de singe.

IDENTIFICATION DES ENTEROVIRUS -

L'identification des types d'enterovirus a été réalisée grâce aux antiserum de référence obligeamment envoyés par le Serum State Institut de Coppenhague pour les polio-

virus. La National Foundation for Infantile Paralysis-Microbiological Associated, pour les poliovirus, les virus Coxsackie types A 9, B 1, B 2, B 3, B 4, B 5 et les virus ECHO type 4,14, Pool A, B, C.

L'identification se conduit toujours de la même façon : mélange d'une quantité égale d'un milieu tampon contenant le virus inconnu et de l'antiserum connu. Inoculation après une heure d'incubation de ce mélange à 2 tubes de culture de tissu à raison de 0,1 ml par tube, et ce pour chaque type d'antiserum. On ajoute toujours à la série des tubes ainsi inoculés :

- 1 tube de culture de tissu inoculé avec le seul virus à typer, dit témoin virus.
- 1 tube de culture de tissu inoculé avec chacun des antisérum utilisés dans les typages.
- 1 tube de culture de tissu, témoin non inoculé.

Si les tubes inoculés avec un mélange antisérum x - virus inconnu restent normaux, alors que d'une part les autres tubes mélange antisérum (y, z) - virus inconnu et les tubes témoin virus sont détruits dans les mêmes délais et que d'autre part les témoins sérum et le témoin normal restent normaux, on dit que le virus inconnu a été neutralisé par l'antiserum x et qu'il s'agit donc du virus x.

On met d'abord en présence le virus avec les 3 antiserums poliomyélitiques ; s'il n'est pas neutralisé on le met en présence des antisérum Coxsackie et ECHO. Ceci est le schéma de base que nous avons toujours employé. Les variations ont porté sur la quantité infectante du virus introduite dans le mélange. Nous avons d'abord essayé de pratiquer un titrage préalable du virus : on dilue de façon logarithmique, de 10-1 à 10-8 un passage du virus en culture de tissu congelé après destruction de la nappe cellulaire.

On inocule chacune des dilutions, on surveille de façon habituelle et on choisit la dilution qui donne une destruction totale en 4 jours, pour l'opposer en quantité égale à l'antiserum connu.

Cette méthode précise nous a donné quelques déboires en cela que le typage étant toujours effectué un certain temps après le titrage, dans des conditions obligatoirement différentes, la dilution choisie n'était plus valable lors de la neutralisation, le virus avait quelquefois baissé de titre. La lecture de la neutralisation, trop longue, peut être modifiée par plusieurs facteurs : vieillissement des cellules, apparition secondaire dans le milieu du virus préalablement neutralisé.

Une autre technique certainement la meilleure, mais nécessitant beaucoup de cellules et de manipulations est celle du titrage et du typage simultané.

La technique que nous avons finalement adoptée plus simple nous donne cependant de bons résultats. Nous utilisons tous les virus à une dilution de 10-3 pour être sur d'avoir un démarrage du virus et une destruction cellulaire rapide permettant une lecture précoce et ainsi plus nette.

Nous avons rencontré 10 virus qui n'ont été neutralisés par aucun de nos antisérum, 8 pourtant manifestaient à la lecture et à la coloration un effet cytopathogène type enterovirus. Ce sont sans doute des souches de virus ECHO dont nous n'avons pas l'antiserum. On sait en effet le grand nombre de leur variété dans une même souche.

Nous voulons clore ce chapitre des Enterovirus en faisant une synthèse de nos résultats que nous rapprocherons des multiples publications faites dans le monde sur ce sujet : proportion relative des poliovirus et autres enterovirus lors d'épidémies de poliomyélites paralytiques et d'affection "type-polio ".

Dans le tableau IV, l'infection à virus poliomyélitique parait prépondérante dans notre région ; sauf dans le cas de la méningite aseptique où les autres enterovirus entrent en jeu aussi souvent que les poliovirus. Cependant disons le une fois encore, ce tableau est faussé par notre matériel d'étude. La souche Hela peu ou pas sensible à

TABLEAU IV

	Poliovirus	autres Enterovirus			
		Coxsackie	ECHO	Non identifiés	TOTAL
Méningite aseptique	4	1	2	1	8
Parésies Transitoires	4			2	6
Méningo Encéphalites	2				2
Paralysies + Séquelles	11	2	1	1	15
Polio Bulb. DCD	1	1			2
TOTAUX	22	4	3	4	= 33

certain enterovirus tandis que tous les auteurs qui rapportent des résultats comparables ont travaillé sur rein de singe ou sur souriceau nouveau-né animal de choix pour l'isolement des virus Coxsackie.

En 1951 KIBRICK, MELENDEZ et ENDERS ont étudié 13 selles de malades cliniquement atteints de poliomyélite paralytique où ils ont retrouvé 12 poliovirus, 19 selles de malades atteints d'affection type polio, ou ils ont retrouvé 3 poliovirus ; 1 Coxsackie B ; 7 virus non identifiés, qui se sont révélés ultérieurement être des virus ECHO. En 1954 les mêmes auteurs, toujours travaillant sur les selles de malades atteints de poliomyélite paralytique ou non, ont obtenu les résultats suivants : 23,2 % de poliovirus ; 7,2 % de virus Coxsackie ; 64 % de virus ECHO. Il y avait eu une épidémie de méningite aseptique à virus ECHO 6 qui s'accompagnait d'une atteinte musculaire minime (87). Notons que lors de deux études, les auteurs travaillaient sur plusieurs sortes de cultures de tissu trypsinisées : peau et muscle d'embryon humain, utérus post-natal, rein humain, rein de singe.

En 1953-54 lors de l'épidémie de poliomyélite en Suède, T.J. JONHSON étudie l'incidence du virus Coxsackie. Il isole sur souriceau nouveau-né 26 souches de virus Coxsackie A et B dans les selles de sujets atteint de méningite aseptique (son étude portait sur 222 cas) (82).

En 1955 DUNCAN et RHODES au Canada inoculent 521 L.C.R. de méningite aseptique lymphocytaire sur rein de singe et isolent 3 souches de virus Coxsackie B et 2 "orphans" (45). En 1956, Annelise GODFRETSEN au Danemark isole 21 souches d'ECHO 9 de 147 L.C.R. sur rein de singe (65). La même épidémie à ECHO 9 sévit dans toute l'Europe (15) et NIHOUL (129) en Belgique isole 29 souches de virus ECHO 9 de L.C.R. sur rein de singe ; il dit d'ailleurs à ce propos que ces virus ne peuvent être isolés que sur tissu de primo-culture

En 1956-57, LAVILLAUREIX à Strasbourg a pu étudier 732 L.C.R. Il a eu 52 résultats positifs, 24 poliovirus, tous dans des cas de poliomyélite paralytique et 18 virus Coxsackie tous dans des cas de méningite aseptique bénigne ; il n'a jamais isolé de virus ECHO dans le L.C.R. (92).

En 1956-57 HABEL K. SILVERBERG R.S. et SHELOKOV A., étudient les prélèvements de selles et de gorge de 224 malades atteints de poliomyélite non paralytique ou de méningite aseptique cliniquement nette. Ils utilisent la culture de tissu de rein de singe et l'inoculation aux souriceaux. L'infection poliomyélitique est aussi très importante dans leur étude : 42 % polio, 4 % Coxsackie A, 14 % Coxsackie B, 40 % d'autres enterovirus dont certains ECHO 6, 7 et 8 (68).

En 1957, 100 cas dans le LEICESTER de syndromes méningés parfois accompagnés de Rash. Les prélèvements de gorge ; de selles et de L.C.R. sont inoculés en culture de tissu. On isole des souches de virus ECHO des selles le plus souvent, des prélèvements de gorge et rarement du L.C.R. (140). La même difficulté d'isoler des virus à partir du L.C.R. est noté par DAVIS. Dans 24 cas de méningite aseptique les auteurs isolent II souches de virus ECHO 6 des selles et des prélèvements de gorge mais pas des L.C.R. (35).

En 1957 dans le Connecticut DURBIN et HORTSMANN étudient 56 malades hospitalisés avec le diagnostic clinique de poliomyélite non paralytique, de méningite aseptique, d'affection non spécifique et une poliomyélite paralytique. Après inoculation des selles sur rein de singe les auteurs ont isolés 2 poliovirus type 1 mais surtout des virus Coxsackie et des virus ECHO du type 9 (46).

En 1958 HOWAH fait une étude étiologique sur 52 affections paralytiques et 71 non paralytiques. Dans les 52 cas paralytiques il isole 49 virus poliomyélitiques du L.C.R. et dans les 71 cas non paralytiques 4 poliovirus, 11 ECHO 9, 7 Coxsackie A9, B3, 4 et 5 (78).

HAMMON au cours des travaux aux U.S.A. pour connaitre la valeur prophylactique des γ globulines, rapporte 5 cas de méningite aseptique avec isolement dans les selles de 3 ECHO 4, 1 ECHO 3, 1 Coxsackie B4 (70).

En 1953-58 MEYER JOHNSSON et CRAWFORD ont complété le diagnostic sérologique de leur 713 cas de syndromes neurologiques par l'isolement sur culture de tissu de rein de singe d'enterovirus à partir de gorge, de selles et de L.C.R. Les selles leur ont apporté le plus grand nombre de résultats positifs : 82 poliovirus, 51 virus Coxsackie (en majorité B3, B4, B5) 39 virus ECHO (en majorité type 4, 6, 9) parmi ceux-ci, 4

ECHO 4 et 1 ECHO 9 ont été retrouvés dans le L.C.R. des malades (115).

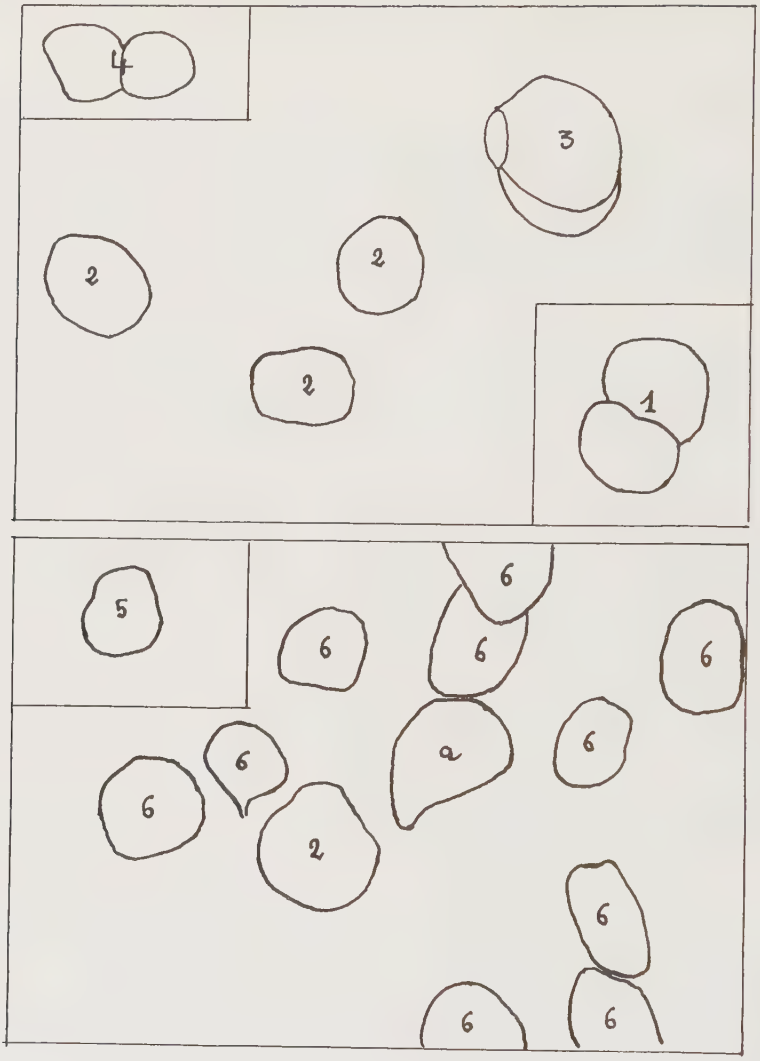
En 1958 à Toulouse une étude menée dans les Laboratoires de notre Maitre le Professeur ANDRIEU a porté sur 203 prélèvements de selles, sujets hospitalisés et sujets contacts. 56 Enterovirus ont été isolés, dont 49 Poliovirus. Le matériel d'étude était la souche cellulaire HELA (3).

Enfin citons la toute récente publication de S. SASLAW avec isolement dans 11 cas de méningite aseptique du virus à partir du L.C.R. Les agents étiologiques se répartissent ainsi : 2 Coxsackie A9, 1 Coxsackie B4, 2 Coxsackie B5 et 5 ECHO 9 (145).

Une autre notion nous parait importante dans cette publication : les auteurs ont inoculé avec chaque L.C.R. simultanément dans un tube de culture de tissu de rein de singe, deux tubes de culture de souche Hela, deux tubes de culture de tissu d'amnios humain. Seuls les tubes de rein de singe ont permis de mettre en évidence les souches virales.

Ceci met l'accent sur la différence entre notre travail et les publications citées plus haut, où l'on a toujours utilisé le rein de singe, matériel de choix pour les enterovirus.
De plus ces travaux représentent le plus souvent les résultats de recherches entreprises à propos d'épidémies nettement caractérisées.
Il semble bien en effet qu'en dehors d'épidémies fulgurantes et massives l'incidence des enterovirus autre que les poliovirus soit relativement peu importante. Cette notion est confirmée par les études systématiques sur une large population et sur un temps relativement long comme celle de KAITER S.S., PAGE M, SUGG M,qui étudiant 811 sérums de malades atteints d'affections cliniquement diagnostiquées: poliomyélite non paralytique,ont trouvés seulement 10 % d'affections causées par les virus ECHO ou les Coxsackie (83).

Pour conclure cet important chapitre de virologie clinique des enterovirus il faut souligner que, tant dans les travaux rapportés que dans les nôtres,la clinique n'a jamais pu apporter de diagnostic étiologique précis. Aucun signe clinique ne permet d'affirmer la présence d'un virus donné, à 2 exceptions près :



a - Cellules normales

1 - Chromatolyse - Chromatine en mottes

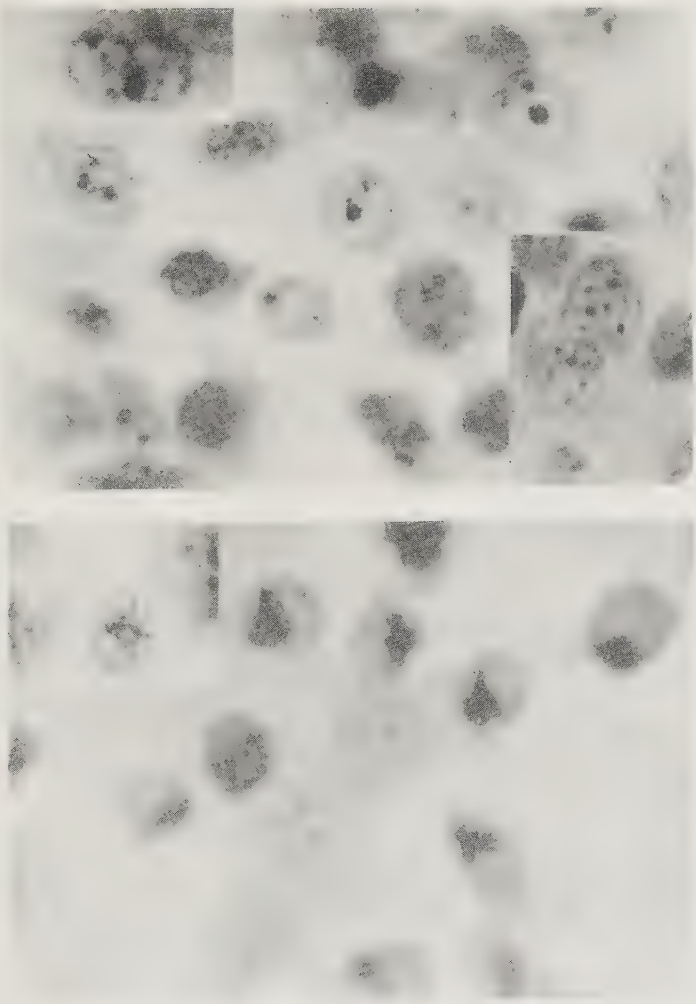
2 - Chromatolyse - Clair nucléaire

3 - Chromatolyse - Individualisation des chromocentres

4 - Chromatolyse et pseudo inclusion

5 - Chromatolyse, chromocentres et début de plicature de la membranne.

6 - Noyaux plissés et inclusion intra cytoplasmique diffuse.



Culture de souche cellulaire Hela Gey 48 Heures après l'infection par un Poliovirus. Type III
Grossissement microscopique x 300 env. (Photog. x 3)

- la poliomyélite paralytique, due dans la majorité des cas au poliovirus.
- la présence d'un Rash qui permet d'évoquer d'une façon quasi certaine un virus ECHO et même un virus ECHO 9 (107) mais le Rash n'apparait que chez les enfants de moins de 15 ans).

Et cependant la virologie plus encore que toute autre discipline biologique à besoin de la clinique pour étayer ses résultats. L'isolement d'un virus même dans le L.C.R. bien qu'il s'agisse d'une source parentérale, ce qui pour KIBRICK est un élément de valeur (131) n'est pas la preuve suffisante d'un role étiologique.

ADENOVIRUS

Il peut paraitre étonnant de trouver ici ce groupe de virus, ayant surtout un rôle dans les affections respiratoires, généralement bénignes. Si dans quelques publications la mort a terminé la maladie à Adénovirus c'est toujours avec des signes respiratoires asphyxiques à type de broncho pneumonie. (62)

Aussi avons nous été d'abord décontenancés devant l'isolement indiscutable de ces souches d'adénovirus dans le L.C.R. de malades présentant des affections assez disparates.

Nous rapporterons nos 11 isolements avec quelques mots d'observation clinique. Nous avons essayé de les classer en donnant tout d'abord les syndromes où un fait anatomique ou biologique a apporté un diagnostic sûr, puis les tableaux cliniques suffisamments nets pour faire admettre un diagnostic clinique et enfin les cas indéterminés.

MAU. André L 22 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus
(Service de Chirurgie infantile Professeur VIRENQUE).

Enfant de 11 mois présentant des crises convulsives, une fontanelle tendue. Pas de syndrome méningé biologique 5 (L.C.R. Alb. : 0,20 ; Cell. : 2,2 et présence d'un Adenovirus non typé).
L'exploration des fontanelles met en évidence une poche sous durale qui entraîne l'intervention chirurgicale. Le chirurgien découvre un kyste arachnoïdien. Les suites opératoires sont compliquées par une surinfection méningée à Escherichia Coli. L'enfant sort deux mois après en bon état général.

SOU. Marie-José L 158 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus Type 7
(Service de Médecine infantile Professeur SOREL)

Adolescente de 15 ans, hospitalisée avec une paraplégie flasque totale, des troubles sphinctériens, une dysesthésie, un signe de BABINSKI bilatéral. La P.L. ne ramène pas le L.C.R., on soupçonne un blocage. L'atlo-occipitale permet d'obtenir un prélèvement de L.C.R. qui montre à l'examen : Alb : 0,25
Cell: 0,8

et l'isolement d'un Adenovirus type 7.
La radiographie vertébrale met en évidence un pincement de D4-D5. Le lipiodol intra rachidien s'arrête net en D3. Aucun traitement médicamentaux n'est mis en oeuvre.

L'enfant passe alors en Chirurgie Infantile (Professeur VIRENQUE) où l'intervention reste exploratrice devant le caractère malin de la tumeur. (Anatomie-pathologie : réticulo-sarcome indifférencié). La malade meurt deux mois après l'intervention.

BON. Gabriel L 243 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus.
(Service de Neurologie. Professeur RISER)

Des épisodes confusionnels à répétitions avaient fait évoquer le diagnostic de sclérose en plaques. L'examen du L.C.R. Alb. : 2 gr ; Cell. : 18 poly, 8 lympho, fait reposer le diagnostic. C'est dans cet échantillon de L.C.R. qu'un Adenovirus, non encore typé a été isolé. Des examens radiologiques (Artériographie, ventriculographie) ne montrent aucune lésion. On pense alors à une neuro-mélitococcie. Le séro-diagnostic Malte est positif dans le L.C.R. au taux de 1/512. Le traitement (Streptomycine-tetracycline-cortancyl) amène une amélioration clinique et biologique.

JEA. Gaston L 190 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus Type 1
(Service du Professeur RISER L 190).

Hospitalisé pour un syndrome méningé clinique discret, biologique, net (Alb. 1gr. Cell. 230 poly, 175 lympho). Une gène à la marche est due à la paralysie du quadriceps droit. Le seul autre signe neurologique est l'abolition du réflexe rotulien droit.

La récupération est assez lente à la sortie quinze jours après le début, la malade marche avec une canne.

Diagnostic clinique : Poliomyélite

Résultats virologiques :
- isolement dans le L.C.R. d'un adénovirus Type 1
- isolement dans les selles d'un poliovirus Type 3
- séroneutralisation de l'adenovirus du malade par le sérum prélevé au 5e jour de la maladie 1/100.

LAF. Jacques L 215 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Méningite aseptique (L.C.R. Alb. 0,95 ; Cell 36 ; P.N. 80 %) sans aucun autre signe neurologique, régresse en 3 jours. Isolement dans le L.C.R. d'un adenovirus non encore typé. Isolement dans la gorge d'un poliovirus type III.

BAR. Marie L 248 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus
(Service de Médecine Professeur PLANQUES).

Méningite aseptique avec trépied méningétique complet et important. (L.C.R. : Alb 0,30 Cell. 103 ; 50 % lympho) aucun signe parétique périphérique. Evolution bénigne. L.C.R. Isolement d'un adenovirus non encore typé.

COU Christian L 23 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus type 1
(Service du Professeur SOREL Médecine Infantile)

Quelques jours après une rhino-pharyngite, syndromes méningés avec myalgies des membres inférieurs, apparition d'une paralysie et accélération du rythme respiratoire qui entraine la mise au poumon d'acier, pendant trois jours

avec perfusion continue sans thérapeutique de déconnection.
Tout régresse en quinze à vingt jours. Le malade sort avec une abolition du réflexe rotulien droit.

- L.C.R. albumine 0,70 Cell. 29
- Isolement dans le L.C.R. d'un adenovirus Type I
- séro-neutralisation du virus du malade :
  - premier sérum prélevé au quinzième jour de la maladie 1/50
  - deuxième sérum prélevé au 23ème jour de la maladie 1/100
- fixation du complément : premier sérum 1/2
  deuxième sérum ± 1/4

LOU. Solange L 244 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Enfant de 10 ans présentant une poliomyélite paralytique, affectant le membre supérieur droit.
L.C.R. : Alb 0,90 Cell 32.
Deux mois après le début de la maladie existence de séquelles importantes, nécessitant le placement de l'enfant dans un centre de rééducation.
Isolement dans le L.C.R. d'un adénovirus non encore typé.

BAQ. Gilbert L 185 - Isolement dans le L.C.R. d'un adenovirus Type 1
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Enfant de 4 ans - 48 heures après une angine banale présente un syndrome méningé qui en 24 heures se complique d'un syndrome paralytique ascendant, avec troubles respiratoires et de la déglutition, pour aboutir à la mort le soir même malgré hibernation et utilisation de l'appareil d'ENGSTROM.
Isolement dans le L.C.R. d'un adénovirus type 1 (avant hibernation.)

SEG. Marie-Jeanne L 158 - Isolement dans le L.C.R. d'un Adenovirus Type 1
(Service des Contagieux Professeur ANDRIEU)

Après une hospitalisation en neurologie pour quadriplégie massive, sans troubles sensitifs ou sphinctériens, la malade est hospitalisée au Centre de Réanimation Respiratoire des Contagieux pour troubles respiratoires.
L'examen du L.C.R. : Alb. 0,10 ; Cell. : 4
Malgré une trachéotomie et utilisation de l'appareil d'ENGSTROM, la malade meurt.
Isolement dans le L.C.R. d'un adénovirus type 1 (avant thérapeutique de réanimation.)

CAB. Julia L 245 - Isolement d'un Adenovirus
(Service des contagieux Professeur ANDRIEU)

Quelques jours après une pharyngite, la malade a présenté une paraplégie avec troubles sphinctériens et une anesthésie des membres inférieurs qui remonte jusqu'à l'ombilic. L.C.R. Alb 0,80, Cell 59, 65 % de lymphocites. Isolement d'un Adénovirus non typé.
On avait évoqué plusieurs diagnostics cliniques : syndrome de GUILLAIN-BARRE, polynévrite, myélite. Mais des troubles respiratoires apparaissent et malgré trachéo et utilisation de l'appareil d'ENGSTROM, la malade meurt 24 heures après.

GAL. Jean L 186 - Isolement dans le L C.R. d'un Adénovirus type 1
(Service de Neurologie Professeur RISER L 186)

Hospitalisé pour un syndrome grippal avec légère réaction méningée (L.C.R. Alb. 0,8 Cell. 1,6) mais surtout des douleurs thoraciques et cervico-brachiales importantes.

Au cours de l'examen clinique on décèle une hépatomégalie légèrement douloureuse et un subictère.

Aucun examen biologique ne donne de résultats positifs.

Les cliniciens pensent à une amibiase et instituent un traitement à l'émétine, qui semble donner quelques résultats.

- Isolement du L.C.R. d'un adénovirus type 1
- Séroneutralisation du virus du malade par le premier sérum prélevé au 2ème jour de la maladie 1/50.
  par le 2ème sérum prélevé au 10ème jour de la maladie 1/100.
- Fixation du complément : 1° sérum : inférieur à 1/2.
  2° sérum : épuisé.

Si nous nous rapprochons de la pathologie infectieuse classique, cet énoncé pourrait ressembler à celui de cas où l'étude bactériologique aurait mis en évidence un germe saprophyte habituel des muqueuses de l'homme.

Dans trois cas seulement (L 123, L 186, L 190) nous pouvons affirmer que cette présence a été active, en ce sens qu'elle a fait apparaitre chez le malade des anticorps contre son propre virus. Mais cela ne suffit pas à démontrer la responsabilité des virus dans le tableau clinique présenté par le malade.

Il ne peut s'agir là que de passages au cours d'autres affections.

KIBRICK, MELENDEZ et ENDERS dans un travail déjà cité (87) alors qu'ils inoculaient des selles de sujets atteints d'affections cliniquement étiquetées poliomyélite, ont isolé 5,8 % d'adenovirus. Ces 5,8 % d'adénovirus représentaient 9 souches. Trois d'entr'elles furent isolées chez des malades présentant pyrexie et méningisme, mais avec un L.C.R. biologiquement normal sans autre isolement viral.
Les six autres souches d'adénovirus étaient retrouvés dans les selles de malades présentant tous une hypercytose du L.C.R., 4 ayant les signes d'une poliomyélite non paralytique typique, avec isolement dans les selles d'un poliovirus type I. Les serums des malades chez qui ont été isolés ces Adenovirus présentent des Anticorps neutralisant les Adenovirus et les Poliovirus, mais sans augmentation de titre significative.

Les auteurs concluent en soulevant le problème du rapport étiologique possible des Adenovirus et de la Méningite aseptique.

Le seul cas dans la littérature où un adénovirus ait été isolé du L.C.R., est celui rapporté par LELONG et LEPINE (93). Les auteurs ont observé une pneumonie mortelle chez un nourrisson. Ils ont mis en évidence les lésions histologiques propres à l'Adenovirus dans les cellules pulmonaires et nerveuses, et ont isolé l'Adenovirus du L.C.R. prélevé un peu avant la mort.

Mais dans cette observation les principaux signes sont des signes respiratoires, et on reste dans la pathologie classique des Adenovirus, la fragilité du terrain, et d'autres facteurs mal connus qui influent sur les relations hôte-virus sont peut-être responsables de cette grave généralisation.

La majorité des Adenovirus Type 1 rapportée dans nos résultats est assez frappante pour qu'il soit permis d'évoquer ici la notion de persistance de certains types d'Adenovirus (Type 1, 2 et 5). En effet chez les enfants infectés par ces types, on retrouve à plusieurs reprises des décharges de virus dans la gorge et dans les selles, comme s'il existait un portage prolongé dans le tissu lymphoïde pharyngé et qui se manifesterait sous l'effet de divers facteurs (141).

De plus ces porteurs présenteraient dans leur serum des anticorps neutralisant pour le virus présent dans leur tissu lymphoïde.

Le taux élevé d'Anticorps neutralisant dans le serum prélevé au 5ème jour de la maladie dans l'observation L 190, vient à l'appui de cette théorie comme si le virus avait infecté le sujet depuis un certain temps déjà.

ETUDES VIROLOGIQUES -

Sauf les L.C.R. 22 et 23 qui ont été congelés, tous les autres ont été inoculés huit jours au plus après le prélèvement.

A la lecture directe du tube de culture de tissu, l'apparition de cellules compactes et granuleuses, ou la formation d'un réseau a été une première présomption de diagnostic.

L'examen après coloration (Hématoxyline-Phloxine) nous a donné les signes classiques :

- au faible grossissement nappe cellulaire compacte ou réseau.
- a l'immersion, mise en évidence des trois types d'inclusion suivant l'âge de la lésion.

Bien que nous n'ayons pas retrouvé la classification rigoureuse de BARSKI (10), nous avons noté avec une plus grande fréquence les "noyaux en marguerite" (retraction centrale de l'inclusion basophile et très importante vacuolisation du noyau) dans les cas de nappe compacte.

Au Feulgen la masse basophile centrale s'est révélée Feulgen+".

Dès études sérologiques ont complété l'isolement des Adenovirus, tant pour préciser le diagnostic d'adenovirus et le type en cause que pour retrouver chez le malade la trace immunologique de l'infection.

Tout d'abord ont été précisé par Mme le Dr J. DIDIER le diagnostic virologique d'Adenovirus par des Fixations du Complément utilisant comme Antigène le liquide surnageant d'un tube de culture de tissu où s'était multiplié le virus du malade, et un Antiserum de référence (serum humain ou animal ayant des anticorps anti-adenovirus déjà vérifiés).

L.C.R.	Taux de F.C.
L 23	1/32
L 150	1/16
L 158	1/32
L 185	1/8
L 186	1/16
L 190	1/4
L 243	1/16

Le but ultérieur a été de préciser le type d'Adenovirus en cause. Pour cela ont été préparés des Antiserums sur lapin avec les souches L 185, L 186, L 190 (52). Dans un premier temps chaque antiserum préparé a été mis en présence de 13 types d'Adenovirus de collection venus de l'Institut Pasteur (Docteur LEPINE), des U.S.A. (Docteur KIBRICK), et de Coppenhague (Docteur H. VON MAGNUS). Les types 8, 13, 16 et 17 ne faisaient pas partie de la collection du Laboratoire.

Dans un deuxième temps les mêmes Antiserums de lapin ainsi identifiés ont été mis en présence des souches L 23, L 150, L 158, L 185, L 186, L 190.

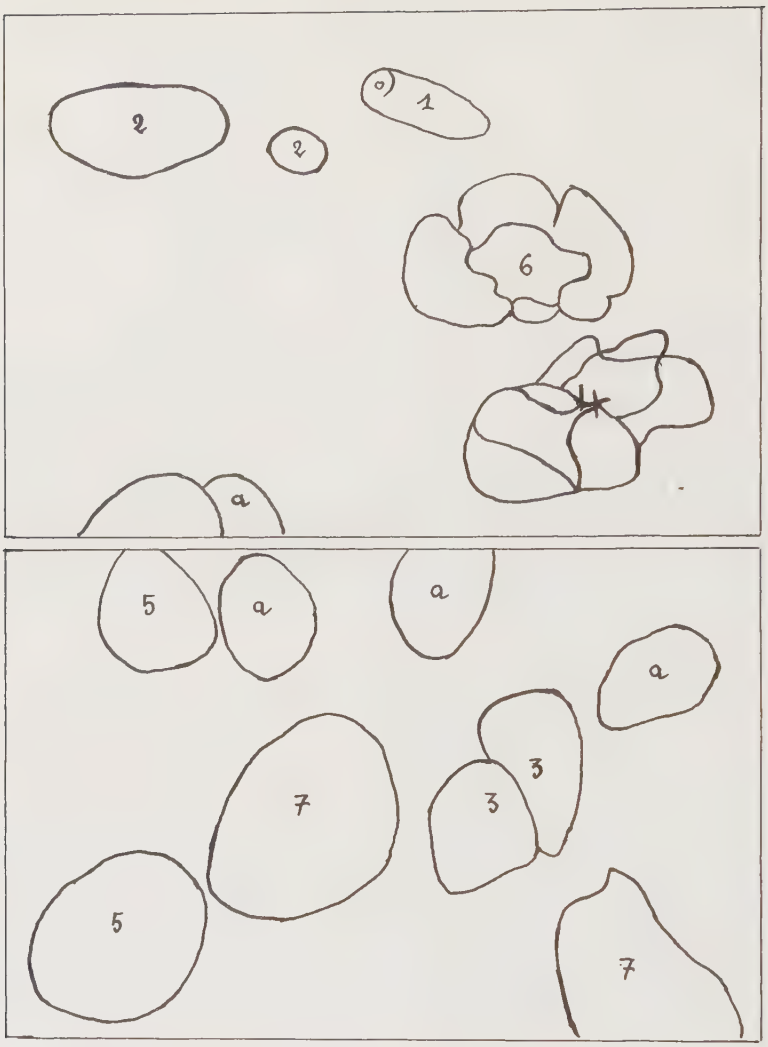
Cette épreuve a permis d'identifier certainement la souche L 158 comme un Adenovirus Type 7.

Le diagnostic de probabilité de type I pour les souches : L 23, L 150, L 185, L 186, L 190, a été confirmé par le service des virus de l'Institut Pasteur (Docteur Ch. CHANY).

La présence d'Anticorps anti-adénovirus a été recherchée dans le serum de malades par la seroneutralisation pour mettre en évidence les Anticorps neutralisants spéciques du type et parallèlement par la Fixation du Complément mettant en évidence les Anticorps de groupe.

Cette dernière réaction donne des taux de beaucoup inférieurs à ceux de la seroneutralisation, ce qui permet de penser qu'elle est spécifique de la maladie à Adenovirus, et non pas seulement de la présence du virus.

Nous pouvons éliminer toute idée de contamination possible d'un L.C.R. virologiquement stérile, par un L.C.R. réellement infecté par l'Adenovirus. En effet certains pré-



a - Cellules normales.

1 - Inclusion intra-nucléaire éosinophile centrant un halo clair.

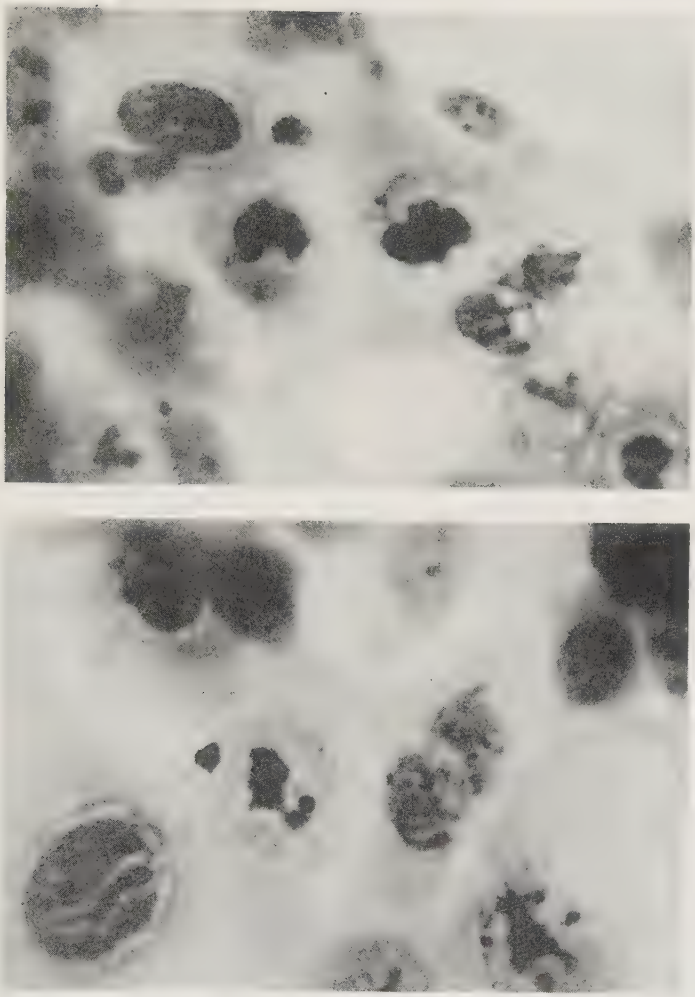
2 - Agglomération des granules éosinophiles.

3 - Masse d'inclusion amphophile

4-5-Début de vacuolisation nucléaire - la masse d'inclusion devient basophile et se rétracte progressivement.

6 - Image en "Marguerite".

7 - Images de rétraction terminale.



Culture de souche cellulaire Hela Gey 5 jours après son infection par un Adéno-virus
Grossissement microscope x 300 env. (Photog. x 3)

lèvements sont voisins (L 22, L 23 - L 185, L 186 - L 243, L 244, L 245). Mais, ou le hasard des inoculations a voulu que les L.C.R. pourtant contigus ne soient pas inoculés ensemble, ou bien si c'était le cas, un nouveau premier passage a été refait à partir de chaque L.C.R. suspect de contamination, en séparant soigneusement les inoculations.

Notons enfin que 3 L.C.R. L 243, L 244, L 245 inoculés systématiquement sur rein de singe n'ont pas manifesté d'effet cytopathogène, même après coloration. Alors que dès le premier passage en culture de tissu HELA l'effet cytopathogène s'était manifesté nettement.

Ceci montre bien qu'à l'encontre des Enterovirus la souche cellulaire Hela est un matériel de choix pour l'isolement des Adenovirus.

C'est volontairement que nous terminons ce chapitre sur une note technique. Cet aspect est en effet un des plus importants de cette étude mais aussi un des mieux définis.

Les conclusions cliniques que l'on pourrait tirer, d'ordre trop général, sont réservées pour le chapitre de la discussion.

VIRUS NON IDENTIFIES

Il nous reste encore à rapporter les recherches que nous avons mises en oeuvre pour identifier sans y réussir deux souches virales cytopathogènes en culture de tissu Hela, trouvées aussi dans des cultures de L.C.R.

Cliniquement les deux observations présentent des circonstances épidémiologiques voisines et une évolution comparable.

GUI. Yannick - Isolement dans le L.C.R. d'un agent cytopathogène
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Enfant de 9 mois 1/2 qui entre dans un état encéphalitique. Un frère vient d'avoir les Oreillons, mais la petite malade ne présente aucun signe d'atteinte viscérale par le virus ourlien. Le syndrome méningé clinique est discret, mais biologiquement marqué : L.C.R. : Alb. 0,30 ; Cell. : 101,6. 100 % de lymphocytes.
En 8 jours l'évolution est spontanément favorable.

FAN. André - L 69 - Isolement dans le L.C.R. d'un agent cytopathogène
(Service de Médecine Infantile Professeur SOREL)

Un syndrome méningé brutal atteint un garçon de 14 ans avec une température à 40°, un subictère, des épistaxis.
La P.L. révèle une albumino achie à 0,40 et une hypercytose à 240 cellules, 50 % de Lymphocytes et 50 % de Polynucléaires.
Toutes les épreuves biologiques sont négatives.
L'évolution est spontanément favorable en 6 à 8 jours.
Dans les jours qui suivent un frère du malade présente un syndrome méningé avec parotidite de type ourlien.

RECHERCHES VIROLOGIQUES -

Le L.C.R. L 27 a été congelé pendant 3 ans, avant d'être inoculé sur culture de tissu, souche Hela et primoculture Amnios.

Sur Hela il y a eu un effet cytopathogène net dès le 1er passage et pendant 3 passages successifs. La sero-neutralisation par nos antiserums Enterovirus a été négative

pour tous les types.

Sur Amnios au 3ème passage, il y a eu un effet cytopathogène très marqué aboutissant à la destruction presque totale de tube de culture de tissu.

L'effet cytopathogène n'a été coloré ni sur Hela, ni sur Amnios.

Quatre ans après le prélèvement, on a essayé deux inoculations successives à l'oeuf embryonné qui n'ont pas permis de mettre en évidence un pouvoir hémagglutinant du liquide amniotique ou allantoïque.

Le L.C.R. L 69 n'a pas été congelé. Il a été inoculé 3 jours après le prélèvement sur primo culture d'amnios, et 8 jours après le prélèvement sur souche Hela. Deux passages ont été pratiqués en primo-culture, qui n'ont mis en évidence aucun effet cytopathogène.

On a pratiqué 6 passages sur Hela qui ont permis de constater un effet cytopathogène variable en intensité, mais toujours présent.

Enfin 3 passages successifs sur oeufs embryonnés pratiqués 2 mois après le prélèvement, n'ont pas mis en évidence de pouvoir hémagglutinant du liquide allantoïque ou amniotique.

La lésion des cellules Hela à la coloration (Hématoxyline-Phloxine) est légère. Elle se manifeste essentiellement à la périphérie, et ne rappelle pas d'effet cytopathogène défini.

Il n'y a eu neutralisation par aucun de nos serums anti-enterovirus.

Les selles de ce malade inoculées sur Hela ont causé pendant 4 passages un effet cytopathogène identique à celui provoqué par le L.C.R.

Le lavage de gorge n'a fait apparaître d'effet cytopathogène sur aucun des 4 passages effectués sur Hela, ni de pouvoir hémagglutinant du liquide amniotique ou allantoïque après 2 inoculations en oeufs embryonnés.

DISCUSSION -

Dans le cas de L. 27, tous les signes évoquent une étiologie ourlienne :

Tableau clinique de méningo-encéphalite pure, syndrome biologique avec réaction lymphocytaire importante du L.C.R., notion épidémiologique.

La souche isolée en Culture de tissu peut bien avoir été une souche de virus ourlien, et l'échec d'isolement en oeuf embryonné peut être dû aux 4 années d'attente qui séparent le prélèvement de l'inoculation.

Malheureusement, il n'y a pas eu de coloration pour nous renseigner sur la nature de l'effet cytopathogène.

Le cas L. 69 est moins net cliniquement; le tableau moins pur (existence d'un subictère, d'épistaxis, d'un gargouillement de la F.I.D.), le syndrome liquidien, avec 50 % de Polynucléaires n'entrent pas dans le cadre classique.

Il se pourrait donc que l'affection ne soit pas dûe au virus ourlien.

Les résultats des recherches virologiques entreprises semblent éliminer ce virus :

L'inoculation sur oeuf embryonné relativement précoce a été négative.

La coloration de l'effet cytopathogène n'a pas montré les lésions pseudo-syncytiales décrites par Henlé (71). Elle a cependant permis d'éliminer un Enterovirus.

Un plus grand éventail d'antiserums de référence nous aurait peut-être permis l'identification.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

Nous envisagerons la discussion de nos résultats sous deux aspects bien distincts :

- un aspect purement technique concernant notre matériel de travail : nos prélèvements et notre souche cellulaire ;
- un aspect théorique concernant la confrontation de ces résultats virologiques avec la pathologie, la physio-pathologie humaine et la biologie des virus.

ASPECT TECHNIQUE

Des études virologiques n'ont jamais été faites à grande échelle dans les L.C.R.

Dans les premières années les recherches virologiques en Pathologie humaine ont porté sur les selles essentiellement, sur les lavages de gorge, très rarement sur les L.C.R., ceci étant dû sans doute à la difficulté de se procurer ces prélèvements, mais aussi à ce que la Virologie fait partie davantage des disciplines de Recherche , que des disciplines appliquées à la Pathologie humaine.

Le Laboratoire de Bactériologie Clinique du C.H.R., nous a permis d'examiner un très grand nombre de L.C.R. venant de services hospitaliers très divers. Nous avions ainsi une place de choix qui n'appartient que rarement aux Laboratoires de Virologie.

C'est pour cela que les résultats s'écartent un peu de la norme habituelle. Cependant, dans la Littérature, la publication d'isolement viral à partir des L.C.R. n'est pas une rareté, ce qui prouve bien que les virus peuvent s'y rencontrer.

Pratiquement tous les laboratoires de Virologie travaillent actuellement sur des primocultures et en particulier sur culture de rein de singe.

De nombreux auteurs ont constaté leur échec d'isolement des Enterovirus sur culture cellulaire Hela (129) (145).

D'après la clinique, nous-même, travaillant avec la souche cellulaire Hela, pouvons compter un certain nombre d'échecs, comme nous l'avons exposé avec l'ensemble de nos résultats.

En premier lieu nous insistons sur le parti pris avec lequel il faut rechercher le Poliovirus sur Hela, surtout lorsque l'abondance du virus risque d'être très faible dans le prélèvement.

De plus nous avons noté de réelles difficultés non pas à l'isolement mais à l'identification des virus Coxsackie et ECHO. L'absence de destruction rapide de la nappe cellulaire Hela masque la netteté de l'effet protecteur de l'antiserum spécifique dans les épreuves de sero-neutralisation rendant la lecture délicate.

Par contre d'autres publications, plus rares, mais plus récentes démontrent la particulière sensibilité des cellules Hela aux Adeno-virus. A ce propos, des études comparées de la sensibilité des diverses souches et primoculture de tissu ont été pratiquées (66), mais aussi une étude récente de CRAMBLETT (25) qui nous parait particulièrement intéressante et que nous rapportons ici en détail.

Ces auteurs ont inoculé au cours d'une épidémie hospitalière, des prélèvements de gorge d'enfants atteints de pneumopathie, en même temps sur tube de primo-culture de rein de singe et de souche cellulaire Hela.

Lors du premier passage, les deux types de tissu ont été atteints. Mais au deuxième passage, la nappe cellulaire de rein de singe était indemne, alors que les tubes de culture de tissu Hela montraient toujours l'effet cytopathogène des Adenovirus. Les auteurs ont alors prélevé le milieu surnageant des tubes de 2ème passage de rein de singe dont la nappe cellulaire était apparemment normale, et l'ont inoculé à de nouveaux tubes de culture de tissu Hela, les-

quels ont mis en évidence l'effet cytopathogène des Adenovirus.

Ceci permet d'expliquer nos nombreux isolements d'Adenovirus, la moindre particule infectante se multipliant et se manifestant nettement sur Hela, alors que les propriétés cytopathogènes de ces virus se perdent en culture de rein de singe.

Par conséquent en n'employant qu'un seul matériel d'étude, on élimine automatiquement un certain domaine du diagnostic virologique. Le Laboratoire de Virologie idéal, qui voudrait entreprendre le diagnostic de toutes les affections virales décrites par le monde (que nous avons données dans notre chapitre II), devrait donc avoir à sa disposition plusieurs types de Culture de Tissu (pour Enterovirus, Adenovirus, Myxovirus, Virus herpétique etc...), les oeufs embryonnés (pour myxovirus, ornithose), et une animalerie variée (pour Arbor virus, virus de la C.M.L.)...

Aussi il parait sage de se limiter à une virologie de région géographique et d'adapter ses moyens de travail aux virus les plus fréquemment rencontrés. Le travail pratique, d'ailleurs, entraîne automatiquement cette sélection.

Il nous semble que dans ce cadre, la souche cellulaire Hela permet un travail de diagnostic virologique tout à fait valable. Et les résultats que nous avons obtenus, en multipliant les passages pour chaque prélèvement étudié, sont assez larges et assez sûrs, pour servir de base à *notre discussion théorique*.

Les différents groupes de virus que nous avons isolés méritent maintenant d'être envisagés en raison des *problèmes théoriques* qu'ils soulèvent.

LE VIRUS HERPETIQUE ET MENINGO ENCEPHALITE -
Sa présence dans le L.C.R. fait l'accord absolu de la Clinique et de la Virologie.

On peut affirmer que la Méningo-Encéphalite Herpétique existe réellement en Pathologie Humaine, et comme le montre la bibliographie à ce sujet, il y a périodiquement une publication dans le monde qui rapporte une manifestation neurologique de l'infection herpétique.

LES ENTEROVIRUS -

Nous adoptons ici une attitude un peu paradoxale en soulevant deux problèmes autour de la gravité du pronostic vital ou fonctionnel donnée comme caractère exclusif du poliovirus. Il apparaît après étude virologique que le poliovirus peut non seulement donner des tableaux cliniques sans atteinte paralytique, ce qui est classique, mais encore que dans certains cas les paralysies poliomyélitiques sont régressives sans séquelles. Par contre nous rencontrons des affections graves parfois mortelles, dues à d'autres Enterovirus que le poliovirus, relevées dans nos observations ou dans des publications récentes.

1 - *POLIOVIRUS ET SYNDROMES PARALYTIQUES REGRESSIFS*

ALB. Aldo L 223 (Tableau I)
(Centre Hospitalier d'Auch - Docteur PUJO)

Une paraplégie totale, avec abolition des réflexes moteurs des Membres Inférieurs, se manifeste chez cet enfant le 29-11-1959, précédée par un syndrome méningé 8 jours avant.

Au 6ème jour de l'Hospitalisation la récupération se manifeste déjà particulièrement rapide. Le 10-12-1959, soit 12 jours après l'admission, l'enfant quitte le service sans aucune séquelle motrice (On a dû insister pour le garder au dela du 8ème jour).

Isolement dans le L.C.R., la gorge et les selles d'un Poliovirus type III.

Nous ne retiendrons pas l'observation de PEL. Richard L 217 (Serv. du Pr. SOREL) qui a présenté une paraplégie et une paralysie du Deltoïde droit, le tout ayant régressé en Trois semaines :

l'enfant avait reçu, 1 mois avant le début de la maladie la 1ère injection de vaccin antipoliomyélitique (L.C.R. isolement d'un Poliovirus Type I).

Par contre deux autres observations sont à considérer, car les séquelles sont minimes en comparaison de l'atteinte initiale.

BRI. Jean-Pierre L 196 (Tableau I)
(Service du Professeur SOREL, Médecine Infantile)

Une paraplégie totale, avec abolition des réflexes, précédée de 4 jours par un syndrome digestif. 15 jours après l'hospitalisation, l'enfant quitte le service avec une démarche tout à fait correcte.

Isolement dans le L.C.R. d'un poliovirus type III.

SEG. Pierre L 241 (Tableau I)
(Centre Hospitalier d'Auch, Dr PUJO)

Une quadriplégie se constitue rapidement. On note même une note bulbaire et encéphalitique donnée respectivement par une dysphagie, une diplopie et un

strabisme.

Il n'y a cependant pas de troubles respiratoires. L'état reste grave pendant une dizaine de jours, puis le malade récupère rapidement ses fonctions motrices. Au 20ème jour il se tient debout, puis marche, écrit et mange seul. Il n'y a pas d'amyotrophie.

A la sortie le 5-5-1960, il reste un léger strabisme, une aréflexie rotulienne et achilléenne.

Isolement dans le L.C.R. d'un poliovirus type III

2 - *ENTEROVIRUS (Coxsackie, ECHO) ET SYNDROMES PARALYTIQUES AVEC SEQUELLES* -

Dans notre chapitre : Etude des Virus Coxsackie et ECHO, certaines observations rapportent des tableaux cliniques extrêmement graves d'un point de vue fonctionnel ou même vital. Nous les rappelons rapidement :

L 33 : Paraplégie du Membre supérieur Gauche avec amyotrophie du deltoïde. Isolement dans le L.C.R. d'un virus Coxsackie B 1.

L 183 : Syndrome paralytique ascendant avec troubles respiratoires bulbaires et mort. Isolement dans le L.C.R. d'un virus Coxsackie B5.

L 113 : Paralysie du Membre supérieur Gauche, sans signe de récupération. Isolement dans le L.C.R. d'un Enterovirus non identifié.

L 163 : Paraplégie totale sans amélioration fonctionnelle, 3 mois après. Isolement dans le L.C.R. d'un enterovirus non identifié.

Depuis quelques années déjà, des publications ont rapporté des affections paralytiques dûes à d'autres virus que les Poliovirus. Le virus Coxsackie A7 a même été un temps identifié comme Poliovirus Type IV.

En Allemagne, de Juillet 1951 à Août 1954, VOGEL isole 48 souches de virus Coxsackie des selles de malades dont certains présentent une poliomyélite paralytique clinique.

En 1956, LAVILLAUREIX isole un virus Coxsackie A9 des selles d'un malade atteint d'ataxie cérébelleuse (170).

On peut dans ces cas suspecter une association entre le virus isolé et le poliovirus non démontré.

Par contre KIBRICK et BERNISHKE en 1956 ont publié le cas d'un nouveau-né mort de myocardite et de Méningo-Encéphalite. Ils ont isolé un virus Coxsackie B3 de selles, du

myocarde et du L.C.R. L'examen anatomo-pathologique de la moelle montre des lésions identiques à celles induites par le poliovirus (85).

Aux U.S.A. en 1957 (130) un premier cas de poliomyélite paralytique où l'agent étiologique a été identifié comme un virus Coxsackie A7 est publié.

La même année, l'étude complète de HABLE et LOOMIS (69), apporte des preuves irréfutables du rôle étiologique du virus Coxsackie A7 dans l'atteinte paralytique. L'isolement dans les selles du virus Coxsackie A7 a été complété par une étude sérologique entièrement négative pour les 3 types de poliovirus - ce qui élimine une association - et par l'étude anatomo-pathologique de 2 cas mortels avec syndrome bulbaire; Les lésions histologiques du système nerveux central sont celles de la poliomyélite.

En 1958 HAMMON et Coll. (70) lors de l'étude réalisée aux U.S.A. sur l'action prophylactique des γ globulines, publient 6 cas d'affections paralytiques avec des séquelles légères, dont les agents pathogènes sont respectivement : virus Coxsackie B4, virus Coxsackie B5, virus Coxsackie A9, virus ECHO 16, 2 fois un virus ECHO 4.

Un ECHO 4 a également été isolé des selles d'un enfant présentant une paraplégie flasque (18). D'autres cas d'affections pseudo-poliomyélitiques ont été rapportés comme dus a d'autres types de virus ECHO, type 2 et 6 (154).

De 1953 à 1958, MEYER, JONHSON et CRAWFORD font le diagnostic sérologique d'affections paralytiques : Dans un cas, la F.C. est positive pour l'antigène Ourlien, dans un autre cas, elle est positive pour l'antigène Coxsackie B. De plus dans 2 cas d'encéphalites ils isolent de la gorge et des selles 1 virus Coxsackie A, et, dans un autre cas d'encéphalite ils isolent à la nécropsie un virus Coxsackie B4 du Tissu cérébral (116).

En 1958 KIBRICK et BERNISHKE, rapportent 2 cas semblables à leur première publication quant au tableau clinique et à la gravité, mais où l' agent étiologique est ici un virus Coxsackie de type B4. Les lésions de la corne antérieure de la moelle, identiques à celles de la poliomyélite, sont retrouvées à l'autopsie du nouveau-né. Chez les souris inoculées en vue d'isolement, à côté de la lésion spécifique de la graisse sous-scapulaire due au virus Coxsackie B existent

aussi les lésions médullaires de type poliomyélitique (86).

Dans sa publication de Novembre 1959, V. DROUHET signale l'existence de virus Coxsackie B3 et B5 dans les selles d'enfants frappés d'affections paralytiques périphériques sans séquelles graves (40).

Outre cette opposition, poliovirus pouvant donner des affections paralytiques régressives et autres enterovirus pouvant donner des affections graves, tout ce qui précède accentue cette impression d'uniformité dans la pluralité des manifestations pathologiques virales.

En effet la longue énumération du Chapitre II montre déjà que tous les virus connus en pathologie humaine peuvent se manifester par un tableau neurologique très peu différent, dans des conditions variables.
On peut trouver dans la dernière publication de LENNETTE (94) 11 cas de paralysie type poliomyélitique dûs au virus ourlien. Enfin n'oublions pas que la 1ère complication neurologique décrite de la varicelle, est une paralysie périphérique (61).

En outre, toujours dans ce même Chapitre II, on peut voir qu'un même virus peut donner des tableaux cliniques très divers. Cette notion d'un même virus réalisant des affections aussi variables en gravité doit faire poser le problème des relations virus-hôte (116).

BODIAN (14) a dit récemment à propos du virus poliomyélitique, que les variations de virulence et d'infectiosité dépendaient essentiellement du comportement des particules virales elles-mêmes, variables au cours des processus infectieux.
MEYER, JONHSSON, CRAWFORD (116) et HORSFALL (76), pensent que le neurotropisme des agents viraux et est plus potentiel que réel. Mais les facteurs qui justement potentialisent le pouvoir pathogène des virus nous sont actuellement inconnus, soit qu'ils tiennent au virus, soit qu'ils tiennent à l'homme. Enfin rappelons que dès 1928 AYCOCK avait senti ce problème et lui avait donné le nom d'autarcèse.

Notre travail ne traite à aucun moment des problèmes propres à la vie intracellulaire du virus, que nous n'abor-

derons pas dans cette discussion.

Mais les observations clinico-virologiques commencent à faire soupçonner quelques uns des facteurs venus de l'hôte, capables d'influencer le pouvoir infectant du virus chez l'homme.

L'observation de KIBRICK de myocardite et de Méningoencéphalite du nouveau-né, celle de LEPINE de la Pneumonie mortelle du nourrisson à Adenovirus, permettent d'invoquer le terrain fragile que représente un nouveau-né.

En dehors de la pathologie virale proprement dite, *les problèmes de dissémination et de présence mal expliquée d'un agent viral dans le L.C.R.*, sont maximum à propos de nos isolements d'Enterovirus, (Poliovirus excepté), et d'Adenovirus.

Il ne s'agit pas ici, de la manifestation inhabituelle du pouvoir pathogène de ces virus, mais de leur présence dans le L.C.R. au cours d'affections dont l'étiologie est par ailleurs bien établie.

Rappelons l'isolement d'un Virus Coxsackie B5 au cours d'une méningite Tuberculeuse (L 82) d'un virus ECHO dans une intoxication (L 43), d'un virus ECHO 14 dans un cas d'Oreillons (L 35), d'un virus ECHO 4 dans une méningite pyogène (L 37), d'un Enterovirus non identifié dans un traumatisme cranien (L 230), d'Adenovirus Type 7 dans une Tumeur de la moelle, d'un Adenovirus dans une Neuro-mélitoccocie, (L 243), d'un Adenovirus Type I dans une poliomyélite paralytique, d'un Adenovirus dans une méningite aseptique probablement poliomyélitique (L 215).

Nous allons essayer de retrouver quelques facteurs communs au franchissement de la barrière méningée par ces différents virus.

On peut remarquer assez souvent que la barrière méningée avait déjà subi une agression :

- *soit infectieuse,* Bacille de KOCH dans la méningite tuberculeuse, Pneumocoque dans la méningite purulente, virus ourlien dans les oreillons.
- *soit mécanique,* Kyste arachnoïdien et tumeur de la moelle et peut être même Albuminorackie dans la Neuro-mélitoccoccie.

On peut aussi retenir les *modifications du mécanisme physiologique humain* : Hibernation, que l'on retrouve dans un de nos cas, déconnection, basse fréquence, utilisation d'appareils à respiration accessoire.

On ne connait pas exactement les répercussions de ce dirigisme thérapeutique sur l'organisme dont les constantes peuvent être modifiées et les équilibres rompus. On ne peut préciser la limite en deçà de laquelle le traitement correcteur devient agressif pour le mécanisme physiologique humain. Il y a peut-être ainsi une sidération des divers mécanismes de défense, permettant la dissémination ou la multiplication virale.

Nous avons arbitrairement schématisé ces constatations encore peu nombreuses, dont l'importance et la valeur en pathologie virale ne pourra être définie que par des recherches virologiques plus exactes et plus poussées.

C O N C L U S I O N

243 L.C.R., prélevés au cours de syndromes neurologiques divers, ont été examinés, entre le mois de Juillet 1958 et le mois d'Avril 1960.

Il en a été isolé 62 souches virales qui se répartissent de la façon suivante : 1 virus herpétique, 48 Enterovirus, 11 Adenovirus et 2 agents cytopathogènes non identifiés.

Ces virus ont été isolés en Culture de Tissu, sur souche cellulaire Hela Gey et identifiés par leur effet cytopathogène examiné après coloration et par les épreuves de séro-neutralisation spécifique .

Dans un grand nombre de cas nos résultats positifs sont en accord avec les phénomènes pathologiques, nous permettant de retrouver les caractères cliniques et épidémiologiques propres à chaque infection virale étudiée.

Dans d'autres cas, au contraire, il n'y a pas de concordance entre la clinique et la virologie, soit que le rapport étiologique du virus isolé et du tableau clinique ne soit pas encore fermement établi et classiquement admis, soit qu'une preuve clinique ou biologique enlève toute importance étiologique au virus isolé, posant ainsi le problème de la dissémination virale dans l'organisme humain.

Vu :
Le Président :

ANDRIEU

Vu :
Le Doyen,

LAZORTHES

Vu et permis d'imprimer
Toulouse, le 16 Février 1961

Le Recteur,
Président du Conseil
de l'Université,

DOTTIN

B I B L I O G R A P H I E

1 - AFZELIUS ALM L. - Aseptic encephalo-meningitis in Gothenburgh. 1932-1948. Clinical and experimental investigation, with special reference to the viruses of Herpes, influenza, mumps, and C.M.L. *Acta. Med. Scandi. Suppl. CCLXIII - 1951.*

2 - ANDREWES G.H., WORTHINGTON G. - Some new or little known respiratory viruses. *Bull. de l'O.M.S. 1959-***20** (435-443).

3 - ANDRIEU G., ENJALBERT L., LAPCHINE L., LARENG MB., et DIDIER J. - La poliomyélite dans le Sud-Ouest de la France. Rev. Hyg. Méc. Soc. 1959-**7** (123-130).

3bis - ANDRIEU G., ENJALBERT L. - Une réaction sur lame pour la recherche des Anticorps hétérophiles. *Ann. Inst. Pasteur* 1951-**80** (442).

4 - ANDRIEU G., PASSA, TOURNIAIRE. - Les accidents neuro-méningés des Oreillons. *Revue de Médecine* 1931-**I** (1-31).

5 - ARMSTRONG C. - The experimental transmission of poliomyelitis to the Eastern cotton rat. (Sigmodon Hispidus) *Public Health Report.* 1939-**54** (2-302).

6 - ARMSTRONG C. - Herpes simplex virus recovered fron the C.S.F. of a suspected case of Lymphocytic Chorio-Meningitis. *Public Health Report* 1953-**5** (16-21).

7 - BARON S., RABSON A.S. - A culture strain (LAC) of human epithelial like cells from an Adenocarcinoma of the Lung. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 1957. **96** (515-518).

8 - BARSKI G., LEPINE P., MONACI V. - Culture in vitro du virus de la poliomyélite en présence de tissu tonsillaire humain. *Ann. Inst. Pasteur.* 1953. **84** (825-840).

9 - BARSKI G., DE SOUZA P., MONACI V., LEPINE P. - Résultats de la culture in vitro du virus de la poliomyélite sur différentes souches cellulaires d'origine humaine. *Ann. Inst. Pasteur* 1953 **85** (576-585).

10 - BARSKI G. - Caractère spécial de la lésion cellulaire causée in vitro par les virus du groupe A.P.C. et sa valeur diagnostique. *Ann. Inst. Pasteur.* 1956. **91** (614-622).

11 - BERNHEIM M., SOHIER R. - Méningite herpétique curable de l'enfant. *Revue lyonnaise de médecine* 1954. **3** (361-364).

12 - BERNYSH M., GOLDBLUM N. - Sur l'étiologie des méningites-encéphalites non bactériennes en Israël. *Haruyuah.* 1955. **48** (58-62).

13 - BERTOYE A. et BRETTE R. - Etude d'une souche de virus d'hépatite épidémique. Lésions histologiques de l'embryon de poulet. *Ann. Inst. Pasteur.* 1950. **78** (700-706).

14 - BODIAN D. - Vème Conférence Internationale de la poliomyelite. Coppenhague 26-28. VII 1960 - PM 1961. **69** (249-253).

15 - BOISSARD G.P.B., STOCKES L.J., MACRAE A.D. et MAC FALLUM F.O. - Isolation of viruses related toECHO virus Type 9 from outbreaks of aseptic meningitis. *Lancet* 1957. **I** (500).

16 - BOYER G.S., LENCHTENBERGER C., GENSHEY H.S. - Cytological and cytochemical studies of Hela cells infected with Adenovirus. *The Jour. of Exper. Med.* 1957. **105** (195-216).

17 - de BRION G., GRUEST J. - Isolement et maintien in vitro d'une souche essentiellement constituée de cellules épithéliales et obtenue à partir de rein de bovidés. *Ann. Inst. Pasteur.* 1957. **92** (426-429).

18 - BURER M., KRECH V. - Faits cliniques et distributions des virus ECHO. - Rapport de 1 cas avec myélite paralytique du à un virus ECHO 4 *Helv. Med. Acta.* 1957. **24** (434-441).

19 - CAMBIER J. - Encéphalites et méningites herpétiques humaines. *Med.* 1955. **63** (286-287).

20 - CASALS J., BROW L. - Hemagglutination with Arthropod-born virus. *Jour. of Exper. Med.* 1954. **99** (429-449).

21 - CHANG R.S. - Continuous subcultivation of epithelial-like cells fron normal human tissues. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 1954. **87** (440-445).

22 - CLEMENT R. - Méningites à virus. P.M. 1954. **62** (173-176).

23 - COLORETTO F. - Hepatite aiguë dans des cas rapidement progressifs de Poliomyélite. *Giorn. Mal. Infett.* 1958. **10** (377).

24 - Committee on enteric cythopathogenic human orphans (ECHO) virus. *Science.* 1955. **122** (1187-1188).

25 - CRAMBLETT H.G., KAREL J.A. - Illness in children infected with Adenovirus antigenically related to Types 9 et 15. *Pediatrics.* 1960. **25** (822-828).

26 - CREATURO N.E. - Mononucléose infectieuse et Guillain-Barré. *J.A.M.A.* 1950. **13**

27 - CURNEN E.C. - Human diseases associated with the Coxsackie viruses. Bull. N.Y. Acad. Med. 1950. **26** (335).

28 - CURNEN E.C. - Immunology and clinical aspects of Coxsackie viruses. *In Papers and discussion at the 2e Inter. Polio. Conf. 1951.* (121-134).

29 - DALLDORF G. - The Coxsackie group of viruses. *Science* 1949. **110** (594).

30 - DALLDORF G. - The Coxsackie viruses. *Amer. rew. of Microb.* 1955. **9** (277-290).

31 - DALLDORF G. et GIFFORD R. - Clinical and epidemiological observation of Coxsackie virus infection. *New Engl. Journ. Med.* 1951. **244** (868).

32 - DALLDORF G., SICKLES G.M. - An unidentifiated a filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science.* 1948. **108** (61).

33 - DALLDORF G., SICKLES G.M. - The Coxsackie virus. In diagnostic for virus and rickettzial diseases. 1956 *Publ. of Amer. Publ. Health Ann. New-York.*

34 - DALLDORF G., SICKLES G.M., PLAYER H., HIFFORD R. - A virus recovered from feces of poliomyelitics patients, pathogenic for suckling mice. *Jour. Exper. Med.* 1949. **89** (567).

35 - DAVIS D.C., MELNICK J.L. - Association of ECHO virus Type 6 with aseptic meningitis. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1956. **92** (839).

36 - DEBRE R. et LELONG M. Pédiatrie. Les éditions médicales Flammarion. Paris. Mise à jour 1960. (1771-1744).

37 - de LAVERGNE V. et KISSEL P. - Les Oreillons in *Traité de Médecine* 1948. *T.I.* Masson. Paris.

38 - DICK G.W.A. - The relationship of Mengo Encephalomyelitis, Encephalomyo carditis, Columbia SK, and MM Viruses. *Journ. of Immun.* 1949. **62** (375).

39 - DICK G.W.A., BEST A.M., ADDOW A.S. et SMITHBURN K.C. - Meningoencephalomyelitis. A hiterto unknown virus affecting man. *Lancet* 1948. **255** (286-289).

40 - DROUHET V. - Infection à virus entériques chez les enfants et syndromes cliniques associés. *Ann. Inst. Pasteur* 1960. **98** (562-568).

41 - DUFREY J.M., ALLEN J.E. - Le syndrome de Guillain-Barré comme manifestation de la mononucléose infectieuse. Rapport de 1 cas. *New-England Jour. of Med.* 1956. **254** (279-280).

42 - DUJARRIC DE LA RIVIERE R. - La grippe est-elle une maladie à virus filtrant ? *C.R. de l'Acad. Scie.* 1918. **167** (606).

43 - DULBECCO R. - Production of plaques in Monolayer Tissue Culture by simple particules of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 1952. **38** (747-752).

44 - DULBECCO R. et VOGT M. - Plaques formation and isolation of pure lines with poliovirus. Jour. of Exper. Med. 1954. **99** (167-182).

45 - DUNCAN D., RHODES A.J., MAC NAUGHTON G.A., JOHNSSON C.R. et WOOD L.W. - Aseptic meningitis. Isolationof Coxsackie and unidentified cytopathogenic virus from Cerebrospinal fluid by Tissue Culture method. *Canad. Jour. of Public Health.* 1955. **46** (1-8).

46 - DURBIN L., HORTSMANN D. - Epidémie de Méningite aseptique et d'affection non spécifique dans le Connecticut. 1957. Etudes virologiques et cliniques. *Journ. Biol. Med.* 1958. **30** (429-441).

47 - ENDERS J.F. - Recent observations on Behaviour in Tissue Culture of viruses pathogenic for man. The R E Dyer Lecture. 1954. Nat. Health Inst. U.S.A.

48 - ENDERS J.F. - Cytopathology of viral infections. *Amer. Rewiew of Microb.* 1954. **VIII** (473).

49 - ENDERS J.F., HABEL K. - Mumps in Diagnostic procedures for virus and Rickettzial diseases. 1956. *Publ. of Amer. Publ. Health Ann. New-York.*

50 - ENDERS J.F., PEEBLES T.C. - Propagation in Tissue Cultures of cytopathogenic agents from patient with Measles. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 1954. **86** (277-286).

51 - ENDERS J.F., WELLER T.H., ROBBINS F.C. Cultivation of the Lansing stain of Poliomyelitis virus in various human embryonnic tissues. *Science* 1949. **109** (85-87).

52 - ENJALBERT L., DIDIER J., LARENG M.B. Les Adenovirus. Etude de 17 souches isolées à Toulouse. *Ann. Inst. Pasteur.* 1960. **99** (608-617).

53 - EVANS A.S. - Establishment of human adult tonsil cells in continuous cultures and their virus susceptibilities. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 1957. **96** (752-757).

54 - FASQUELLE R. - Eléments de Virologie médicale 1958. Editions Médicales Flammarion. Paris.

55 - FLEWETT T.H., HOULT J.G. - Influenzal encephalopathy and post influenzal encephalitis. *Lancet* 1958. **2** (11-15).

56 - FJEDE A.H. - Tumor cells in Tissue Culture. *Cancer.* 1955. **8** (851).

57 - GALPINE J.F., MACRAE A.D. - An outbreak of benign meningo-encephalitis. Isolation of Coxsackie virus. *Lancet.* 1953. **I** (37).

58 - GASTINEL P., FASQUELLE R. - Généralités sur les maladies à Ultra-Virus. in *Encyclopédie Médico-chirurgicale* T. 1958. **T. II** (8040 A. 1).

59 - GEARJ H.S., MEASROCH V., PRINSLOO F. - The medical and public health importance of the Coxsackie virus. *South Afr. Med. Jour.* 1956. **30** (806-810).

60 - GENSE H. - Contribution à l'étude de la méningite lymphocytaire curable. Thèse Paris. 1951.

61 - GERAUD J. et RISER M. - Les Encéphalo-myélites secondaires. *Traité de Médecine.* 1949. **T.XV**, Masson. Paris.

62 - GERBAUT J. - Epidémie familiale de maladies à virus du groupe A.P.C. chez 3 enfants. (1 cas mortel) Etude clinique, anatomique, virologique. *Bull. Soc. Méd. Hop.* de Paris. 1957. **73** (519).

63 - GEY G.O., BANG F.B., GEY M.K. - Reponses of a variety of normal and malignant cells to continuous subcultivations and some pratical applications of these responses to the problems in the biology of disease. *Ann. N.Y. Acad. of Sc.* 1954. **58** (976-980).

64 - GIRARDI A.J., WARREN J., GOLDMANN C., JEFFRIES B. - Growth and C F antigenicity of Measles virus in cells derivingfrom human heart. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1958. **98** (18-22).

65 - GODTFRESEN A., VON MAGNUS H. - Isolation of ECHO virus type 9. from cerebrospinal fluids. *Danysh Med. Bull.* 1957. **4** (233-236).

66 - GRAYSTON J.T., MAC CALLUM M.A. - La sensibilité des différentes cultures de tissu pour les Adeno virus. *Journ. of Infec. Diseases.* 1958. **103.**

67 - GRENIER B. - Les myocardites aiguës primitives de l'enfant et les virus Coxsackie. 1958. Ed Masson. Paris.

68 - HABEL K., SILVERSBERG R.S., SHELOKOW A. - Isolation of enteric viruses from cases of aseptic meningitis. *Ann. Y. Acad. S.* 1957. **67** (223-229).

69 - HABEL K. et LOOMIS. - Coxsackie A 7 virus and the Russian Poliovirus Type IV. *Proc. Soc. Exper. and Biol.* Med. 1957. **95.**

70 - HAMMON W., YOHN D.S. - A study of certain non poliomyelitis and poliomyelitis enterovirus infections J.A.M.A. 1958. **167** (727-735).

71 - HENLE G., DEINHARDT F. - Propagation and primary isolations of mumps virus in tissue cultures. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1955. **89** (556-560).

72 - HENLE G., GIRARDI A., HENLE W.A. - Non transmissible cytopathogenic effect of influenza virus in tissue culture accompagned by formation of non infectious hemagglutinins. *The Jour. of Exper. Med.* 1955. **101** (25-41).

73 - HILLEMANN M.R., WERNER J.M. - Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. soc. Exp. Biol. Med.* 1954. **85** (183-188).

74 - HISSARD M.R. - Inoculation positive à la cornée du lapin de L.C.R. d'une malade atteinte de méningite aigüe bénigne à lymphocytose surabondante. *Bull. de la Soc. Franç. de Derm. et Syph.* 1933. **40** (1119-1323).

75 - HOAGLAND C.L., SHARK R.E. - Infectious hepatitis. A rewiew of 200 cases. J.A.M.A. 1946. **130** (615).

76 - HORSFALL F.J. - Virus infection and virus disease in man. *Proc. of the Staff meeting of the Mayo clinic.* 1960. **35** (269-306).

77 - HORTSMANN D.M. - The new ECHO viruses and their role in human disease. *Arch. of Int. Med.* 1958. **102** (155-161).

78 - HOWAH W.F., DICKINSON D.G. - Identifiable viruses and clinic pictures of poliomyelitis and aseptic meningitis relationship. *A.M.A. Jour. of Disease of Child.* 1958. **96**.

79 - HUEBNER R.J. - The virologist dilemna. in "Virus in search of disease". *Ann. of the N.Y. Acad. of Sc.* 1957. **67** (430-438).

80 - HUEBNER R.J., ARMSTRONG C., BEERMANN E.A. Studigs of Coxsackie viruses. *J.A.M.A. 1950.* **144**.

81 - JAWETZ E., KIMURA S., NICHOLS A.N., THYGRESON P., HANNA L. - New types of APC viruses from epidemic kerato-conjonctivite. *Science. U.S.A. 1955.*

82 - JOHNSSON T. - Occurence of Coxsackie virus infection in an epidemic of poliomyelitis. *Acta pathol. and microb. Scand. 1956. Suppl. III* (187).

83 - KALTER S.S., PAGE M., SUGGE M. - Laboratory and epidemiologic results on specimens submitted for poliomyelitis diagnosis. *Abstracted in Fed. Proc. 1958.* **17** (518).

84 - KARSON D.T., WINKELSTEIN W.Jr., COHEN S. - Isolation of ECHO virus Type 6 during and outbreak of seasonal aseptic meningitis. *J.A.M.A. 1956.* **162** (1298).

85 - KIBRICK S., BERNISHKE K. - Acute aseptic myocarditis and meningoencephalitis in the newborn child infected with Coxsackie virus Type B. *New Engl. Jour. Med. 1956.* **255** (886-889).

86 - KIBRICK S., BERNISCHKE K. - Severe generalised disease (Encephalo-hepato myocarditis) due to Coxsackie B5 virus. *Pediatrics.* 1958. **22**.

87 - KIBRICK S., MELENDEZ L., ENDERS J.F. - Clinical association s of enteric viruses with particular reference to agents exhibiting properties cf ECHO group. *N.Y. Acad. of Sc.* 1957. **67.** (311-325).

88 - KLEMOTA et al. - Poliomyelite paralytique avec un nombre normal de cellules dans le L.C.R. *Helsinghi. Nor. Med.* 1956. **IX** (1488-1489)

89 - KREIS B. - La maladie d'Armstrong, chorio méningite lymphocytaire. *Sem. Hop. de Paris.* 1948. **24** (1018-1023).

90 - LAMY M., JAMMET M.L., GRANGER A., VESLOT J., DANIEL P., NAZELOFF C. - L'herpés du nouveau-né. *Arch. Franç. de Péd.* 1960. **XVII.**

91 - LARENG-ANDRIEU M.B. - Intérêt du diagnostic biologique dans le domaine de certaines viroses. (Grippe-Ornithose) Thèse Toulouse 1955.

92 - LAVILLAUREIX J. - Notice sur travaux et titres scientifiques. Strasbourg 1958.

93 - LELONG M., LEPINE P., ALISON F., LE TAN-VIHN, STAGE P., CHANY CH. - La pneumonie à virus du groupe APC chez le nourrisson. Isolement du virus. Les lésions anatomo-pathologiques. *Arch. Franç. de Ped.* 1956. **XIII** (1092-1026).

94 - LENNETTE E.H., CAPLAN G.E. - Mumps virus infections, simulating paralytic poliomyelitis. A report of 11 cases. *Pediatrics.* 1960. **25** (788-797).

95 - LEPINE P. - Le virus coxsackie et ses rapports avec la maladie de Bornholm. *Sem. des Hop. de Paris* 1953. **29.** (3533).

96 - LEPINE P. - Diagnostic des méningites lymphocytaires à virus. *Sem. des Hop. de Paris.* 1956. **32.**

97 - LEPINE P., ARTZET F., CEOLIN G. - Conservation du virus herpétique. *Ann I.P.* 1960. **98** (750-755).

98 - LEPINE P., ATANASIU P. - Trois cas d'infection de laboratoire par le virus de la maladie de Newcastle. *Ann. Inst. Pasteur.* 1950. **79** (193-196).

99 - LEPINE P., BARSKI G., DE BRION G., MONACI V. - Culture in vitrodu virus poliomyelitique sur tissu humain adulte. *Compte-Rendu des Séances de l'Acad. des Sc.* 1953. **236** (154-155).

100 - LEPINE P., SOHIER R. - Techniques de laboratoire, appliquées au diagnostic des maladies à virus. 1954. Masson. Paris.

101 - LEPOW M.L., CARR D.H. - Une étude clinique et biologique de la maladie due au virus ECHO 9 dans une cité de logements. *A.M.A. Jour. of Diseases oh Child.* 1958. **96.**

102 - LEVADITI C. - Au sujet de l'étiologie de l'encéphalite post-vaccinale. *Ann. Inst. Pasteur.* 1950. **79** (711-720).

103 - LOMBUR O. et al. - La signification diagnostique d'un grand nombre de polynucléaires dans le L.C.R., ne présentant pas de méningite pyogène. *Kozl. Per. Gyernek. Gyiorgyaszat.* 1957. **10** (294-299).

104 - MAC CONKY B., DEW R.A. - Neurological disorders associated with Asian Influenza. *Lancet.* 1958. **2** (15-17).

105 - MAC LEAN D.M., MELNICK J.L. - Association of mouse pathogenic strain of ECHO Type 9, with aseptic meningitis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1957. **94** (656).

106 - MAC NAIR SCOTT T.F. - Herpes simplex in "Diagnostic procedures for viral and rickettzial disease 1956. Publ. of American Public Health. Ann. N.Y.

107 - MACRAE A.D. - Enterovirus. *British Medical Bulletin*. 1959. **15** (210-215).

108 - MARVIN L. - Fatal infection by the Coxsackie B virus in the newborn. *A.M.A. Jour. of Dis. of Child*. 1959. **97.**

109 - MATHEWSON COMMISSION. Epidemic encephalitis. Etiology, epidemiology, treatment. Report of a suvey by the Mathewson Commission. Columbia University Press. 1929.

110 - MELNICK J.L. Tissue Culture methods for the cultivation of poliomyelitis and other viruses. in "Diagnostic procedures for viral and rickettzial disease. 1956. *Amer. Publ. Health Assoc. N. Y.*

111 - MELNICK J.L. - Advances in the study of Enterovirus. *Prog. Med. Virology* 1958. T. I (59-105) Ranger - Barrel N.Y.

112 - MELNICK J.L., CURNEN E.C. - The Coxsackie group. In Viral and Rickettzial Infections of Man. Lippincott. 1952.

113 - MELNICK J.L., KAPLAN A., ZABERT E., CONTEIRAS G., LARKUM N.W. - An epidemy of paralytic poliomye litis characterised by dual infections with poliomyelitis and Coxsackie virus. *Jour. Exper. Med.* 1951. **94**. (471).

114 - MELNICK J.L., WALTON, MEYERS. - Isolation of Coxsackie Virus during a summer outbreak of acute minor illness. *Publ. Hearth Report.* 1953. **68**. (1187).

115 - MENUT G. - A propos de 5 cas d'affections neurologiques graves de l'enfant dont un Syndrome de Guillain-Barré, mise en évidence du virus Coxsackie. *Arch. Franç. de Péd.* 1952. **IX**. (978).

116 - MEYER H.M., JONHSSON R.T., CRAWFORD I.P. - Central nervous system syndroms of viral etiology. *The Amer. Jour. of Med.* 1960. **29** (334-347).

117 - MILOVANOVIC G., ENDERS J.F., Measles virus culture on Amnion cells and embryonnated eggs. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1957. **95**.

118 - MISAO T., KOBAYUSHI. - Etude sur la mononucléose infectieuse. Isolement d'un agent sur la souris à partir du sang de la moelle osseuse et, des ganglions lymphatiques chez un malade atteint de mononucléose Infectieuse. *Kyusho. Jour. Med. Sc.* 1955.

119 - MOGABGAB W.J., GREEN J.J., DIERKHISING O.C., PHILLIPS I.M. - Isolation and cytopathogenic effect of Influenza B virus in Monkey Kidneys culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1955. **89**. (654-659).

120 - MOLLARET H. - L'adénite mésentérique aiguë à Pasteurella Pseudo-Tuberculosis. II Etude épidémiologique. *P.M.* 1960. **68** (1447-14449).

121 - MONTGOMERY J., GEAR J., PRINSLOO F.R. - Myocarditis of the newborn, an outbreak in a maternity home in South Rhodesia, associated with Coxsackie Group B virus infection. *South Afr. Med Jour.* 1955. **29**. (608-612).

122 - MOORE A.E., SABACHEWSKI L. - Culture characteristics of permanent lines of human carcinomatous cells. *Cancer Research*. 1955. **15**. (598-607).

123 - MORAN G., MELNICK J.L. - Poliomyelitis virus in Tissue Culture. Use of kidney epithelium grown on glass. *Proc. Soc. of Exper. Biol. Med.* 1953. **84** (558-563).

124 - O'GODENNE M., RIORDAN J.T. - Tissue culture diagnostic of poliomyelitis and aseptic meningitis. *J.A.M.A.* 1955. **158**. (707-712).

125 - PACCAUD M. - Etude des anticorps neutralisant antipoliomyelitiques dans une population restreinte. *Thèse Genève.* 1955. N° 2299.

126 - PAUL J.R., MELNICK J.L. Poliomyelitis. In diagnostic procedures for virus and rickettzial diseases 1956. *Publ. of Amer. Pub. Health Ann. N.Y.*

127 - PARODI A.S. - Le virus Coxsackie et le Syndrome d'Encephalite-Papillite. *C.R. Soc. Biol.* 1954. **148** (1652).

128 - PRUNIERAS et CHARDONNET. - Effet cytopathogène des adenovirus type 7 et 7 A. *P.M.* 1958. **66** (32).

129 - QUERSIN-THIRY, NIHOUL E. - ECHO virus type 9 (new member of Coxsackie group A) as a cause of Epidemic menigitis. Science. 1957. **125** (744-745).

130 - RANZENHOFER E.R., DIZON F.C., LIPTON M.M., STEIGMAN A.J. - Clinic paralytic poliomyelitis with Coxsackie A type 7. *New Engl. Jour. Med.* 1958. **259** (182).

131 - REIMAN HOBART A. - Infectious diseases. *A.M.A. Arch. of Int. Med.* 1959. **104** (288-304).

132 - REISSIG M., HOWES D.W., MELNICK J.L. - Sequences of morphological changes inepithelial cell cultureinfected with poliovirus. *Journ. Exper. Med.* 1956. **104** (288-304).

133 - RIGHTSEL W.A., TEKUSHAN F.M., MAC LEAN I.N. - Tissue culture cultivation of cytopathogenic effect from patients with clinical hepatitis. *Science* 1956. **124**. (226-227).

134 - RISER M. - Méningites infectieuses non puriformes. *Traité de Médecine* 1948. T XVI (578) Masson Paris.

135 - RISER M. et GERAUD J. - Infections spécifiques neurotropes. *Traité de Médecine.* 1948. T XV. (834) Masson. Paris.

136 - ROBBA M.L., VIRAT J. - Les réactions croisées dans la fixation du complément pour le diagnostic sérologique des affections à entérovirus avec les antigènes Coxsackie B et ECHO. *Ste Fse Microb.* 1960-8-XII.

137 - ROBBINS F.C., ENDERS J.F., WELLER T.H. - Cytopathogenic effect of poliomyelitis virus in vitro on human embryonnic tissues. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1950. **75**. (370-374).

138 - ROBBINS F.C., ENDERS J.F. - Tissue culture techniques in the study of animal viruses. *Amer. Jour. Med. Science.* 1950. **220** (316-338).

139 - ROSEN L. - Hemagglutination by adenoviruses. *Virology* 1958. **5** (574-577).

140 - ROTEM C.E. - Meningitis of viral origin. *Lancet* 1957. **I** (502-504).

141 - ROWE W.P., HUEBNER R.J., BELL J.A. - New respiratory and ocular viruses. *Ann. of The N.Y. Acad. of Science* 1957. **67** (255-261).

142 - ROWE W.P., HUEBNER R.J., GILMORE L.K. - Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoïds undergoingspontaneous in Tissue Culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1953. **84** (570).

143 - RUBEN B.A., BENNET H.B. - Mechanisms of agglutination of Macachus rhesus erythrocyts by human hepatitis serum. *Science.* 1957. **126** (117).

144 - SALK J.E., YONGNER J.S. - Use of color change of Phenol Red as the indicator in titrating poliomyelitis virus or its antibody in a tissue culture system. *Am. Jour. Hyg.* 1954. **60.** (214-230).

145 - SASLAW S., WOOLEY C.F. - Aseptic meningitis. Report of eleven cases with C.S.F. isolation of Enterovirus. *A.M.A. Arch. of Int. Med.* 1960. **105** (69-75).

146 - SCHERER W.F., SYVER TON J.T., GEY G.O. - Study on the propagation of poliomyelitis virus. Viral multiplication in stable stains of human malignant cells (Strain Hela) from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Jour. of Exper. Med.* 1953. **97.** (695-709).

147 - SICKLES G.M., FERRINO P., PLACER M. - Isolation and type determination of Coxsackie virus group B, in tissue cultures. *Proc. Soc. Exper. biol. Med.* 1955. **88** (22-24).

148 - SICKLES G.M., MUTTERER M., FERRINO P., PLACER M. - Recently classified of Coxsackie virus group A. Behaviour in Tissue Culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1955. **90** (529-531).

149 - SMADEL J.E., ADAIR C.V. - Poliomyelitis papers and discussion presented at the second international poliomyelitis conference. Coppenhague. *Lippincott. Editions N.Y.* 1952 (220-491).

150 - SMITH et LENNETTE. - Isolation of the virus of herpes simplex and demonstration of intranuclear inclusion from an acute encephalitis. *The Amer. Jour of Pathol.* 1941. **XVII.**

151 - SOHIER R., BUISSIERE J. - Meningites et meningoencephalites à virus observées en France. *P.M.* 1954. **62**(1248-1251).

152 - SOHIER R., PRUNIERAS M., CHARDONNET Y. - Recherches cytochimiques preliminaires portant sur le cycle intra-cellulaire des Adenovirus. *Pathol. et Biol.* 1960. **8** (885-893).

153 - STULBERG C.S., BERMAN L., RUDDEL F.H. - Detroit 6 strain of human epithelial like cells. Virus susceptibilities. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1955. **89** (438-441).

154 - STEIGMAN A.J. - Poliomyelitis properties of certain non poliovirus enterovirusand Heine-Medin disease. *Jour. Mount Sinaï Hosp.* 1958. **25** (391-394).

155 - SWIN E.H. - Microbiological aspects of Tissue Cultures. *Ann. Rew. of Microb.* 1959. **13.** (141-176).

156 - SYLVEST E. - Epidemic myalgia Bornholm disease. 1934. *Oxford University Press. London.*

157 - SYVERTON J.T. - Enteroviruses. *Pediatrics.* 1959. **24** (643-652).

158 - SYVERTON J.T., SCHERER W.F. - Propagation of poliomyelitis virus in culture of Monkey and human testicular tissues. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1951. **77** (23-28).

159 - SYVERTON J.T., SCHERER W.F., EDWOOD P.M. Studies on the properties in vitro of Poliomyelitis virus. The application of strain Hela human epithelial cells for isolation and typing. *Jour. Lab. and Clin. Med.* 1954. **43** (286-304).

160 - THIEFFRY S., MARTIN C., DROUHET V., BOUCHARD J. - Encéphalite herpétique curable. Etudes virologiques et Immunologiques. *Arch. Franç. de Pédiat.* 1955. **XII.** (543).

161 - UTZ J.P., SHELOKOV A.I. - Coxsackie B virus infection. Presence of virus in blood, urine and cerebrospinal fluid. *J.A.M.A.* 1958. **168.** (264-267).

162 - VIVELL O. et coll. - Zur epidemiologic Coxsackie A virus infektionnen in Deutshland. *Deutsh. Med. Wschr.* 1956. **81** (405-407).

163 - VOGEL J., SHELOKOV A. - Absorption-hemagglutination test for Influenza virus on monkey tissue culture. *Science.* 1957. **126** (358-359).

164 - WALKER D.L. - In vitro cell-virus relationship resulting in cell death. *Ann. Review of Microb.* 1960. **14** (177-196).

165 - WARREN S., SMADEL E. - The family relationship of EMC, Columbia, SK, MMet Mengo virus. *Jour.of immun.* 1949. **62** (387).

166 - WELLER T.H., ROBBINS F.C., STODDARD M.B. - Cultivation of the Coxsachie virus in human tissues *Feder. Proceed.* 1951. **II** (486).

167 - WELLER T.H., ROBBINS F.C., STODDARD M.B., FLORENTINO G.L. - Propagation of Coxsackie virus in culture of human tissues. *Jour. of Immun.* 1953. **71.** (92).

168 - WELLER T.H., WITTEN H.M., BELL E.J- The etiologic agents of varicella and herpes zoster. Isolation, propagation, and cultural characteristics in vitro. *Jour. Exper. Med.* 1958. **108** (843).

169 - WHITMANN L., WALLH S., WARREN J. - Herpes simplex encephalitis. A report of two fatal cases. *J.A.M.A.* 1946. **131** (1408-1411).

170 - WIENER S., LAVILLAUREIX J. - Présence d'un virus Coxsackie chez un enfant atteint d'un syndrome de déséquilibration avec hyperthermie. *Arch. Franç. de Pédiat.* 1956. **XIII** (423-426).

171 - WILKINS A.J.W., KOTZ D.M., MELVIS J., GEAR J., PRINSLOO F.R. - Meningoencephalitis due to Coxsackie virus in South Rhodesia. *South. Afr. Med. Jour.* 1955. **29** (25).

172 - WOLINET E., BILLET R. - Deux cas de syndrome de l'angle ponto-cérebelleux présumés zosteriens. *S.H.P.* 1960. **52.**

173 - YOUNGNER J.S. - Monolayer tissue culture. Preparation and standardisation of suspension of trypsinised dipersed Monkey kidney cells. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1954. **85** (202-205).

174 - ZARAFONTIS C.J.D., SMADL J.C. - Fatal herpes simplex encephalitisin man. *The Amer. Jour. of Pathol.* 1944. **XX.**

175 - ZITCER E.M., FOGH J., DUNNEBACK T.H. - Human amnion cells for large scale prodrct of poliovirus. *Science.* 1955, 122 (30).

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - Historique	4
CHAPITRE II - Essai de classification clinique des affections du S.N.C. dues aux virus	16
CHAPITRE III - Matériel et Techniques	34
CHAPITRE IV - Nos Résultats : Etude d'Ensemble	42
CHAPITRE V - Nos Résultats : Etude analytique	48
Virus herpétique	49
Microphotographies	55-56
Enterovirus	57
Microphotographies	78-79
Adenovirus	80
Microphotographies	88-89
Virus non identifiés	90
CHAPITRE VI - Discussion	93
CONCLUSION	102
BIBLIOGRAPHIE	103